

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À MONTRÉAL

IDENTIFICATION ET CARACTÉRISATION DES PARTENAIRES  
D'INTERACTION DE L'INTÉGRASE DU VIH-1

THÈSE  
PRÉSENTÉE  
COMME EXIGENCE PARTIELLE  
DU DOCTORAT EN BIOLOGIE

PAR  
FADILA LARGUET

AVRIL 2013

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À MONTRÉAL  
Service des bibliothèques

Avertissement

La diffusion de cette thèse se fait dans le respect des droits de son auteur, qui a signé le formulaire *Autorisation de reproduire et de diffuser un travail de recherche de cycles supérieurs* (SDU-522 – Rév.01-2006). Cette autorisation stipule que «conformément à l'article 11 du Règlement no 8 des études de cycles supérieurs, [l'auteur] concède à l'Université du Québec à Montréal une licence non exclusive d'utilisation et de publication de la totalité ou d'une partie importante de [son] travail de recherche pour des fins pédagogiques et non commerciales. Plus précisément, [l'auteur] autorise l'Université du Québec à Montréal à reproduire, diffuser, prêter, distribuer ou vendre des copies de [son] travail de recherche à des fins non commerciales sur quelque support que ce soit, y compris l'Internet. Cette licence et cette autorisation n'entraînent pas une renonciation de [la] part [de l'auteur] à [ses] droits moraux ni à [ses] droits de propriété intellectuelle. Sauf entente contraire, [l'auteur] conserve la liberté de diffuser et de commercialiser ou non ce travail dont [il] possède un exemplaire.»

*À mes parents...*

## REMERCIEMENTS

En premier lieu, je tiens à remercier Dr Éric Rassart, mon directeur de recherche, pour m'avoir accueillie dans son laboratoire, m'avoir permis de réaliser mon travail dans de bonnes conditions et pour la formation scientifique qu'il m'a donnée. Je tiens aussi à remercier Dr Elsy Edouard, ma co-directrice, pour ses conseils, sa rigueur, son soutien, sa disponibilité et aussi pour ses efforts considérables tout le long de la réalisation du projet et la rédaction de ce manuscrit.

J'adresse mes plus sincères remerciements au Dr Guy Lemay, de l'Université de Montréal, au Dre Angela Pearson de l'institut Armand-Frappier ainsi qu'au Dr Benoît Barbeau, professeur à l'UQAM pour m'avoir fait l'honneur d'accepter d'évaluer ce travail de thèse.

Je tiens à remercier particulièrement les membres de mon laboratoire pour leur sympathie et leur aide: Oufa, Cyndia et Louis-Charles.

Je remercie également les étudiants avec qui j'ai passé de bons moments et qui ont quitté le laboratoire. Je pense particulièrement à Ouliana, Azadeh et Sonia.

J'aimerais aussi remercier mes amies Sahar et Olga.

Par la même occasion, je tiens à remercier Dr Benoît Barbeau pour avoir mis à ma disposition le matériel de son laboratoire NC3. Je remercie aussi ses étudiantes pour leur aide précieuse.

Je remercie toutes les personnes ayant contribué à ce travail et toutes les personnes qui m'ont soutenue pendant toutes ces longues années.



Je dédie ce manuscrit à mes parents. Je ne les remercierais jamais assez pour tout ce qu'ils ont fait et font encore pour moi.

Que toute ma famille trouve ici l'expression de mon profond amour et de ma profonde gratitude pour son généreux soutien. Merci à mes soeurs, mon frère, mes nièces et mes neveux. Merci Hadia et Mehdy, mes rayons de soleil. Vous savez toujours comment rendre votre tante heureuse.

## TABLE DES MATIÈRES

LISTE DES FIGURES .....	x
LISTE DES TABLEAUX .....	xii
LISTE DES ABRÉVIATIONS .....	xiii
RÉSUMÉ GÉNÉRAL .....	xvi
INTRODUCTION .....	1
CHAPITRE I	
ÉTAT DES CONNAISSANCES .....	4
1.1 Le VIH-1: historique et classification .....	4
1.2 Structure et organisation génétique du VIH-1 .....	8
1.2.1 Structure de la particule virale .....	8
1.2.2 Organisation du génome .....	9
1.3 Le cycle de réplication du VIH-1 .....	16
1.3.1 Les étapes précoces .....	16
1.3.2 Les étapes tardives .....	25
1.4 L'intégrase et l'intégration .....	41
1.4.1 Structure de l'intégrase .....	41
1.4.2 L'intégration .....	45
1.5 Les partenaires d'interaction de l'intégrase .....	50
1.5.1 BAF .....	53
1.5.2 INI1 .....	54
1.5.3 EED .....	56
1.5.4 HSP60/HSP10 .....	56
1.5.5 DNA-PKs .....	57

1.5.6 ATM/ATR .....	58
1.5.7 hRad18 .....	58
1.5.8 Von Hippel Lindau binding protein 1 .....	59
1.5.9 Gemin2 .....	60
1.5.10 LEDGF/p75 .....	60
PROBLÉMATIQUE ET OBJECTIFS .....	65
CHAPITRE II	
IDENTIFICATION OF PUTATIVE CELLULAR HIV INTEGRASE	
INTERACTING PROTEINS .....	67
Avant-propos .....	68
2.1 Résumé .....	69
2.2 Abstract .....	70
2.3 Introduction .....	71
2.4 Findings .....	72
2.5 Conclusion .....	77
2.6 Acknowledgements .....	78
2.7 Figure legends .....	82
CHAPITRE III	
THE DDX5 AND DDX17 RNA HELICASES INTERACT WITH HIV-1	
INTEGRASE AND MODULATE VIRUS REPLICATION .....	86
Avant-propos .....	87
3.1 Résumé .....	88
3.2 Abstract .....	89
3.3 Introduction .....	90
3.4 Materials and methods .....	93
3.4.1 Cell culture .....	93
3.4.2 Virus stocks .....	93
3.4.3 HeLa-CD4 infection .....	94
3.4.4 LuSIV infection .....	94

3.4.5 Plasmids .....	94
3.4.6 siRNAs .....	96
3.4.7 Immunoprecipitation experiments .....	96
3.4.8 Purification of recombinant His-tagged proteins and affinity pull-down assays .....	97
3.4.9 Transient knockdown/overexpression and time course infection ..	97
3.4.10 Transient knockdown and single round infection .....	98
3.4.11 Quantitative RT-PCR gene expression analysis .....	98
3.4.12 MTS/PMS assay .....	99
3.4.13 Quantification of HIV-1 DNA species .....	99
3.4.14 Luciferase assay .....	101
3.4.15 Statistical analysis .....	101
3.5 Results .....	102
3.5.1 DDX5 and DDX17 specifically interact with HIV-1 integrase .....	102
3.5.2 Transient knockdown of DDX5 and DDX17 negatively modulates HIV-1 replication .....	102
3.5.3 Transient knockdown of DDX5 affects HIV replication before Integration .....	103
3.5.4 Transient knockdown of DDX17 affects HIV integration .....	104
3.5.5 Transient knockdown of DDX5/DDX17 in target cells has multiple effects in the HIV-1 cycle .....	105
3.5.6 Cells knocked down for DDX5 and DDX17 produce non infectious viruses .....	106
3.6 Discussion .....	107
3.7 Acknowledgements .....	113
3.8 Figure legends .....	114
CHAPITRE IV	
HDAC1 HISTONE DEACETYLASE INTERACTS WITH HIV-1 INTEGRASE AND MODULATES VIRUS REPLICATION .....	125

Avant-propos .....	126
4.1 Résumé .....	127
4.2 Abstract .....	128
4.3 Introduction .....	129
4.4 Results .....	132
4.4.1 HDAC1 specifically interacts with HIV-1 integrase .....	132
4.4.2 Transient knockdown of HDAC1 inhibits HIV-1 replication .....	132
4.4.3 HDAC1 knockdown affects HIV replication before integration .....	133
4.4.4 Transient knockdown of HDAC1 in HIV-1 target cells reduces late RT levels .....	134
4.4.5 Transient knockdown of HDAC1 in HIV-1 producer cells impacts differently the replication in infected cell lines .....	135
4.5 Discussion .....	137
4.6 Methods .....	141
4.6.1 Cells .....	141
4.6.2 Plasmids .....	141
4.6.3 siRNAs .....	142
4.6.4 Production of viral stocks .....	142
4.6.5 Immunoprecipitation experiments .....	143
4.6.6 Expression and purification of recombinant His <sub>6</sub> -tagged HDAC1 .....	143
4.6.7 Affinity pull-down assay .....	144
4.6.8 Transient knockdown/overexpression and multiple rounds Infection .....	144
4.6.9 Transient knockdown and single round infection .....	145
4.6.10 Gene expression analysis and quantitative RT-PCR .....	145
4.6.11 MTS/PMS assay .....	145
4.6.12 Quantification of HIV-1 DNA species .....	146
4.6.13 Luciferase assay .....	147

4.6.14 Statistical analysis .....	147
4.7 Acknowledgements .....	148
4.8 Figure legends .....	149
CHAPITRE V	
DISCUSSION GÉNÉRALE .....	159
RÉFÉRENCES .....	171

## LISTE DES FIGURES

Figure	Page
1.1 Phylogénie, distribution et diversité génétique des lentivirus .....	7
1.2 Structure de la particule virale du VIH-1 .....	8
1.3 L'organisation de la chromatine autour du 5' LTR du VIH-1 .....	10
1.4 Les gènes codés par le VIH-1 .....	12
1.5 Structure de l'enveloppe du VIH-1 .....	14
1.6 Le cycle de réplication du VIH-1 .....	17
1.7 Les différentes étapes de l'entrée du VIH dans la cellule cible .....	19
1.8 Les étapes de la transcription inverse de l'ARN génomique du VIH-1 en ADN double brin .....	23
1.9 L'activation de la transcription par la protéine virale Tat .....	27
1.10 Représentation schématique du génome du VIH-1 et les ARNs épissés et non épissés .....	32
1.11 L'export des ARNm non épissés et partiellement épissés du VIH-1 .....	33
1.12 L'assemblage des particules virales .....	35
1.13 La maturation des particules virales .....	40
1.14 Structure et domaines de l'intégrase de VIH-1 .....	44
1.15 Structure de l'oligomère actif des rétrovirus .....	47
1.16 Le mécanisme d'intégration de l'ADN de VIH-1 .....	48
1.17 Caractéristiques structurales et fonctionnelles de LEDGF/p75 .....	62
2.1 Experimental design for the isolation and the identification of host proteins associated with HIV-1 IN .....	83
2.2 Elution of IN and the associated proteins with 0.5 M NaCl .....	84
2.3 Profile of proteins specifically associated with IN .....	85

3.1 DDX5 and DDX17 specifically interact with HIV-1 integrase .....	117
3.2 DDX5 and DDX17 knockdown inhibits HIV-1 replication .....	118
3.3 DDX5 and DDX17 overexpression increases HIV-1 replication .....	119
3.4 Effects of transient knockdown of DDX5 on HIV-1 DNA species Levels .....	120
3.5 Effects of transient knockdown of DDX17 on HIV-1 DNA species levels .....	121
3.6 Effects of transient knockdown of DDX5 or DDX17 in target cells on HIV-1 replication .....	122
3.7 Effects of transient knockdown of DDX5 or DDX17 in target cells on post-integration steps .....	123
3.8 Down regulation of DDX5 or DDX17 proteins in HIV-1 producer cells reduces virion infectivity .....	124
4.1 HDAC1 specifically interacts with HIV-1 integrase .....	152
4.2 HDAC1 knockdown inhibits HIV-1 replication .....	153
4.3 HDAC1 overexpression increases HIV-1 replication .....	154
4.4 Knockdown of HDAC1 expression decreases HIV-1 late reverse transcription .....	155
4.5 Knockdown of HDAC1 expression decreases the HIV-1 late reverse transcription in single round infection .....	156
4.6 Knockdown of HDAC1 expression in infected cells does not affect post-integration steps .....	157
4.7 Knockdown of HDAC1 expression in HIV-1 producer cells reduces virion infectivity in a cell type-dependent manner .....	158



## LISTE DES TABLEAUX

Tableau	Page
1.1 Les partenaires d'interaction de l'intégrase du VIH-1.	52
2.1 HIV-1 integrase interacting proteins identified by mass spectrometry.	79

## LISTE DES ABRÉVIATIONS

5'P	5' phosphate
AA	Acide aminé
ADN	Acide désoxyribonucléique
ADNc	Acide désoxyribonucléique complémentaire
AP-4	<i>Activating protein-4</i>
ARN	Acide ribonucléique
ARNm	Acide ribonucléique messenger
ARNt	ARN de transfert
ARNt3Lys	Isoaccepteur 3 de l'ARN de transfert spécifique de la lysine
ATM	<i>Ataxia telangiectasia mutated</i>
ATP	Adénosine 5'-triphosphate
ATR	<i>ATM and rad3-related</i>
Att	Sites d'attachement
BAF	<i>Barrier to autointegration factor</i>
BSA	<i>Bovine serum albumin</i>
CA	<i>Capsid</i>
CBD	<i>Chromatine-binding domain</i>
CBF-1	<i>C-promoter binding factor 1</i>
CCD	<i>Central catalytic domain</i>
coll.	Collaborateurs
CRM1	<i>Chromosome region maintenance 1</i>
CTD	<i>C-terminal domain</i>
DMEM	<i>Dulbecco's modified Eagle's medium</i>

DNA-PKs	<i>DNA-dependent protein kinase complexes</i>
EED	<i>Embryonic ectoderm development</i>
ELISA	<i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i>
Env	<i>Envelope</i>
Gag	<i>Group-specific antigen</i>
Gp120	<i>Glycoprotéine 120</i>
Gp41	<i>Glycoprotéine 41</i>
GST	<i>Glutathione S-transferase</i>
GTP/GDP	<i>Guanosine 5'-triphosphate/diphosphate</i>
HAART	<i>Highly active antiretroviral therapy</i>
HDAC	<i>Histone désacétylase</i>
HIV-1	<i>Human immunodeficiency virus 1</i>
HSP	<i>Heat shock protein</i>
IBD	<i>Integrase-binding domain</i>
Imp $\alpha$	<i>Importine <math>\alpha</math></i>
Imp $\beta$	<i>Importine <math>\beta</math></i>
IN	<i>Intégrase</i>
INI1	<i>Integrase interactor 1</i>
KD	<i>knockdown</i>
LEDGF	<i>Lens epithelium-derived growth factor</i>
LSF	<i>Late SV40 factor</i>
LTR	<i>Long Tterminal repeat</i>
Luc	<i>Luciférase</i>
MA	<i>Matrix</i>
MEF	<i>Mouse embryonic fibroblasts</i>
MuLV	<i>Murine leukemia virus</i>
NC	<i>Nucleocapsid</i>
Nef	<i>Negative factor</i>

NES	<i>Nuclear export signal</i>
NF-kB	<i>Nuclear factor kappa B</i>
NHEJ	<i>Non homologous end joining</i>
NLS	<i>Nuclear localization signal</i>
NTD	<i>N-terminal domain</i>
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i>
PCAF	<i>CBp/p300-associated factor</i>
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i>
PFV	<i>Prototype foamy virus</i>
Pi	<i>Postinfection</i>
PIC	<i>Preintegration complex</i>
Pol	<i>Polymérase</i>
pol II	<i>ARN polymérase II</i>
PR	<i>Protéase</i>
p-TEF-b	<i>Positive-transcriptional elongation factor b</i>
pVHL	<i>Von Hippel Lindau</i>
Q-PCR	<i>Quantitative PCR</i>
RBF-2	<i>Ras-responsive binding factor 2</i>
Rev	<i>Regulator of virion expression</i>
RRE	<i>Rev responsive element</i>
RT	<i>Reverse transcriptase</i>
RTC	<i>Reverse transcription complex</i>
Sp1	<i>Specificity protein 1</i>
TAR	<i>Transactivation response region</i>
Tat	<i>Trans-activator of transcription</i>
VBP1	<i>Von Hippel Lindau binding protein 1</i>
Vif	<i>Viral infectivity factor</i>
VIH-1	<i>Virus de l'immunodéficience humaine</i>

## RÉSUMÉ GÉNÉRAL

Le virus de l'immunodéficience humaine de type 1 (VIH-1) est un rétrovirus dont le génome est constitué d'un ARN simple brin qui est transcrit par la transcriptase inverse en ADN double brin. Ce dernier est transporté activement dans le noyau sous forme d'un complexe nucléoprotéique appelé le complexe de préintégration (*PIC*, *preintegration complexe*) qui renferme outre les protéines virales, intégrase et transcriptase inverse, des protéines cellulaires. Une fois dans le noyau, l'ADN viral est intégré dans le génome cellulaire sous forme de provirus par l'intégrase. En plus de l'intégration, l'intégrase joue un rôle important dans différentes étapes du cycle de réplication telles que la décapsidation, la transcription inverse et la maturation des particules virales. L'intégrase est suffisante pour catalyser l'intégration *in vitro*. Cependant, l'intégration *in vivo* est modulée par des facteurs cellulaires dont plusieurs ont été identifiés par différents groupes, en utilisant des approches expérimentales différentes. Afin d'identifier de nouveaux partenaires cellulaires de l'intégrase, nous avons conçu un système de séparation biotine-streptavidine où un ADN reproduisant une portion du U3-LTR viral et renfermant un site d'attachement de l'intégrase a été utilisé comme appât. Les protéines co-purifiées avec l'intégrase grâce à ce système ont été ensuite identifiées par spectrométrie de masse. Parmi les protéines identifiées, plusieurs sont déjà connues dans la littérature comme partenaires d'interaction de l'intégrase, ce qui valide notre approche. Notre intérêt a porté sur les nouvelles protéines, en particulier les RNA hélicases DDX5/p68 et DDX17/p72 ainsi que l'histone désacétylase 1 (HDAC1) dont nous avons confirmé l'interaction avec l'intégrase par co-immunoprécipitation et par pull-down. L'inhibition de l'expression de DDX5, DDX17 ou HDAC1, par siRNA, ainsi que leur surexpression dans des cellules HeLa-CD4 infectées par le VIH-1 ont révélé un rôle positif pour ces protéines dans la réplication virale. Une analyse détaillée de l'ADN viral intégré et non intégré (ADN total, produits de la transcription inverse, les cercles à 2 LTRs) a montré que DDX17 facilite l'intégration alors que DDX5 et HDAC1 semblent favoriser la transcription inverse durant la phase précoce du cycle viral. Les RNA hélicases DDX5 et DDX17, contrairement à HDAC1, jouent un rôle dans la phase tardive où elles exercent une inhibition sur l'expression des protéines virales, mesurée par un rapporteur luciférase dans les cellules HeLa-CD4 et dans les cellules 293T. Par ailleurs, les RNA hélicases se sont avérées nécessaires à l'infectivité du virus car leur déplétion dans les cellules productrices donne naissance à des virions peu infectieux. L'inhibition de l'expression de HDAC1 dans les cellules productrices s'est traduit par une diminution de l'infectivité des virions dans les cellules T Jurkat mais non dans les cellules HeLa-CD4. Le travail présenté dans cette thèse a permis

d'identifier les RNA hélicases DDX5 et DDX17 ainsi que HDAC1 comme nouveaux partenaires d'interaction de l'intégrase et d'établir leur rôle positif dans la réplication virale.

Mots-clés:

VIH-1, intégrase, co-facteurs cellulaires, RNA hélicases, DDX5, DDX17, histone désacétylase1 (HDAC1)

## INTRODUCTION

Le VIH est l'agent étiologique du sida (syndrome d'immunodéficience acquise), maladie décrite pour la première fois en 1981. Il existe deux types de VIH: le VIH-1 et le VIH-2, le VIH-1 étant le plus contagieux. Le VIH infecte principalement les cellules du système immunitaire: lymphocytes T auxiliaires, monocytes/macrophages, cellules dendritiques et cellules microgliales du système nerveux central (Choe *et al.*, 1998). Suite à un effondrement du système immunitaire, les sujets atteints du sida deviennent vulnérables aux infections dites opportunistes et meurent généralement quelques années après l'apparition des premiers symptômes (Goldshmidt, 2004).

La pandémie de VIH/sida est l'une des plus grandes de l'histoire de l'humanité et en 2012 encore, le sida représente l'une des principales causes de mortalité dans le monde et la première cause de mortalité chez les adultes en Afrique. Depuis le début de l'épidémie, plus de 63 millions de personnes ont été infectées par le VIH-1 et 27 millions de personnes sont décédées de maladies liées au sida. Bien que des progrès importants aient été accomplis en termes de prévention et de traitement, 1,7 millions de décès liés au sida ont été enregistrés en 2011 ainsi que 2,2 millions de nouvelles infections par le VIH-1 portant le nombre total de personnes vivant avec le VIH-1 dans le monde à 34,2 millions (d'après le rapport 2012 de l'ONUSIDA). Ainsi, le sida reste une priorité majeure dans le domaine de la recherche biomédicale et de la santé publique au niveau mondial.

Initialement, le traitement de l'infection par le VIH-1 était basé sur la monothérapie avec l'utilisation d'une seule molécule antivirale. La monothérapie a non seulement donné des résultats modestes quant à l'inhibition de la réplication

virale, mais a rapidement conduit à l'émergence de la résistance du virus aux médicaments. Le traitement de l'infection à VIH-1 a été révolutionné au milieu des années 1990 par l'introduction de la multithérapie active également appelée thérapie combinatoire ou encore traitement antirétroviral hautement actif (*HAART, Highly Active Antiretroviral Therapy*) qui a changé l'issue de l'infection à VIH-1 d'une maladie fatale à une maladie chronique. Le succès de la multithérapie tient à l'utilisation de combinaisons de molécules antivirales qui réduit la probabilité de sélection de virus multi-résistants (Arts et Hazuda, 2012). A l'heure actuelle, 33 molécules sont approuvées par la FDA (*Food and Drug Administration*), elles comprennent des inhibiteurs de la transcriptase inverse, des inhibiteurs de la protéase, un inhibiteur de la fusion, un inhibiteur de l'entrée et un inhibiteur de l'intégrase. L'avènement de la multithérapie a été déterminant quant à la réduction de la mortalité et de la morbidité liées à l'infection à VIH-1 et au sida. En effet, avec une bonne observance, la multithérapie est capable d'inhiber la réplication virale pour des dizaines d'années, permettant ainsi l'augmentation de l'espérance vie des personnes infectées (Arhel et Kirchhoff, 2010; Arts et Hazuda, 2012). Cependant et en dépit d'un arsenal d'agents antirétroviraux, la multithérapie s'est avérée incapable d'éradiquer l'infection à VIH-1 qui persiste sous une forme latente dans des cellules réservoirs où la réplication virale est réactivée à l'arrêt des traitements. Ceci impose le maintien des traitements à vie avec tous les effets secondaires qui y sont associés et le risque du développement de la résistance virale. L'échec de la multithérapie en raison de la non-observance des traitements, de leur faible tolérance ou des interactions médicamenteuses a conduit à l'apparition de virus résistants (Arhel et Kirchhoff, 2010; Arts et Hazuda, 2012). Une résistance pour toutes les classes des molécules antirétrovirales disponibles a été rapportée aussi bien chez les patients où la multithérapie a échoué que chez les patients naïfs infectés par des virus résistants (Arts et Hazuda, 2012). Puisque le VIH-1 continue d'évoluer et d'échapper même aux traitements les plus efficaces, de nouvelles approches thérapeutiques seront toujours nécessaires.



La résistance est un problème intrinsèque aux thérapies ciblant les protéines virales à cause du taux élevé de mutations dans ces protéines. Le VIH-1 doit interagir avec différentes protéines cellulaires pour accomplir son cycle de réplication. Étant donné que les protéines cellulaires sont rarement mutées, des approches ciblant les interactions virus-hôte ou les protéines cellulaires elles-mêmes sont envisagées et devraient permettre de s'affranchir des problèmes liés à l'émergence de virus résistants (Cherrier *et al.*, 2010). De nombreux facteurs cellulaires sont déjà connus comme nécessaires à l'infection par le VIH-1 et un nombre encore plus grand de facteurs, identifiés par les criblages à haut débit du génome humain, attend d'être validé (Brass *et al.*, 2008 ; Konig *et al.*, 2008 ; Zhou *et al.*, 2008a). L'importance de ces facteurs en tant que cibles thérapeutiques potentielles est certaine et la recherche de nouveaux facteurs est toujours justifiée.

L'intégrase virale est une protéine clé dans le cycle de réplication du VIH-1 et la recherche de ses partenaires cellulaires a fait l'objet de recherches intenses ces deux dernières décennies, dans la perspective de définir de nouvelles cibles thérapeutiques. C'est dans ce contexte que s'inscrit le travail présenté dans cette thèse.

## CHAPITRE I

### ÉTAT DES CONNAISSANCES

#### 1.1 Le VIH-1: historique et classification

Les premiers cas de sida ont été décrits aux États-Unis en 1981 quand le CDC (*Centers for Disease Control and Prevention*) américain annonce une recrudescence de cas de pneumonies et de sarcome de Kaposi, maladies ayant la particularité d'affecter les personnes immunodéprimées. En 1983, L'équipe de Barré-Sinoussi et Montagnier (Prix Nobel de médecine 2008) ont découvert que le sida pourrait être causé par un rétrovirus (Barre-Sinoussi *et al.*, 1983). Ils ont mesuré une activité transcriptase dans un échantillon prélevé d'un patient atteint d'une lymphadénopathie. Un examen au microscope électronique a permis de visualiser, pour la première fois, le virus qu'ils appelaient LAV (pour *Lymphadenopathy Associated Virus*). En 1984, Gallo et ses collègues ont publié les résultats de l'isolement d'un virus qu'ils considèrent comme responsable du sida, ils l'ont nommé HTLV-III (pour *Human T-lymphotropic virus III*) (Gallo *et al.*, 1984). Dans la même période, Lévy et ses collègues ont caractérisé un rétrovirus qu'ils ont nommé ARV (pour *AIDS-associated retroviruses*) (Levy *et al.*, 1984) et c'est en 1986 que le virus du sida a été nommé VIH (ou HIV). Bien que le VIH-1 ait été isolé pour la première fois en 1983, des traces d'infection à VIH-1 ont été détectées dans un échantillon de sérum et une

biopsie de ganglion lymphatique datant respectivement de 1959 et 1960 à Kinchasa (république démocratique du Congo) (Worobey *et al.*, 2008 ; Zhu *et al.*, 1998).

Le VIH-1 est un lentivirus appartenant à la large famille des rétrovirus qui comprend 7 genres: les Alpharétrovirus, Betarétrovirus, Deltarétrovirus, Epsilonrétrovirus, Gammarétrovirus, Lentivirus et Spumavirus. Ces genres peuvent se diviser en deux catégories : les rétrovirus simples (Alpharétrovirus, Betarétrovirus et Gammarétrovirus) qui ne possèdent que les gènes *gag*, *pol* et *env* et les rétrovirus complexes (Deltarétrovirus, Epsilonrétrovirus, Lentivirus et Spumavirus) qui codent également pour des protéines régulatrices et des protéines accessoires (Goldschmidt, 2004). Le genre des lentivirus est lui-même subdivisé en différents groupes dont la relation d'évolution est présentée dans la figure 1.1.

Le VIH-1 est le plus présent dans le monde alors que le VIH-2 est restreint à l'Afrique de l'Ouest. Il a été proposé que les deux types de VIH proviennent de transmissions zoonotiques indépendantes du VIS (Virus d'Immunodéficience Simien) des primates aux humains en Afrique de l'Ouest et du Centre au début du vingtième siècle. Le VIH-1 est classé en quatre groupes: M (pour *major group*), O (pour *outlier group*), N (pour *non-M, non-O group*) et P. L'ampleur de l'épidémie causée par chaque groupe varie considérablement. Le groupe M est responsable de la pandémie mondiale avec 34 millions de cas d'infections, le groupe O quant à lui touche quelques dizaines de milliers de personnes en Afrique du Centre et de l'Ouest. Le groupe N a été détecté chez quelques individus au Cameroun alors que le groupe P a été récemment identifié chez deux personnes également originaires du Cameroun (Hemelaar, 2012). Les groupes M, et N proviennent directement mais à travers des transmissions indépendantes du SIV<sub>cpz</sub>, infectant le chimpanzee (*pan troglodytes troglodytes*). Les groupes O et P sont plutôt proches du SIV<sub>gor</sub> détecté chez le gorille (*Gorilla gorilla gorilla*) (Gifford, 2012; Hemelaar, 2012). Fait intéressant, le virus est non pathogénique chez son hôte naturel (ex. le SIV<sub>smm</sub> chez les sooty mangabeys, le

SIVagm chez les singes verts d'Afrique ou le SIVcpz chez les chimpanzees) mais devient pathogénique avec la transmission à un nouvel hôte (ex. le VIH-1 et le VIH-2 chez les humains, le SIVmac chez les macaques, celui-ci provient d'une transmission du SIVsmm des sooty mangabeys). Le virus se réplique efficacement chez son hôte naturel mais n'entraîne pas de pathologie, probablement à cause de l'absence de l'activation des lymphocytes qui caractérise l'infection pathogénique chez les humains ou les macaques (Ho et Bieniasz, 2008).

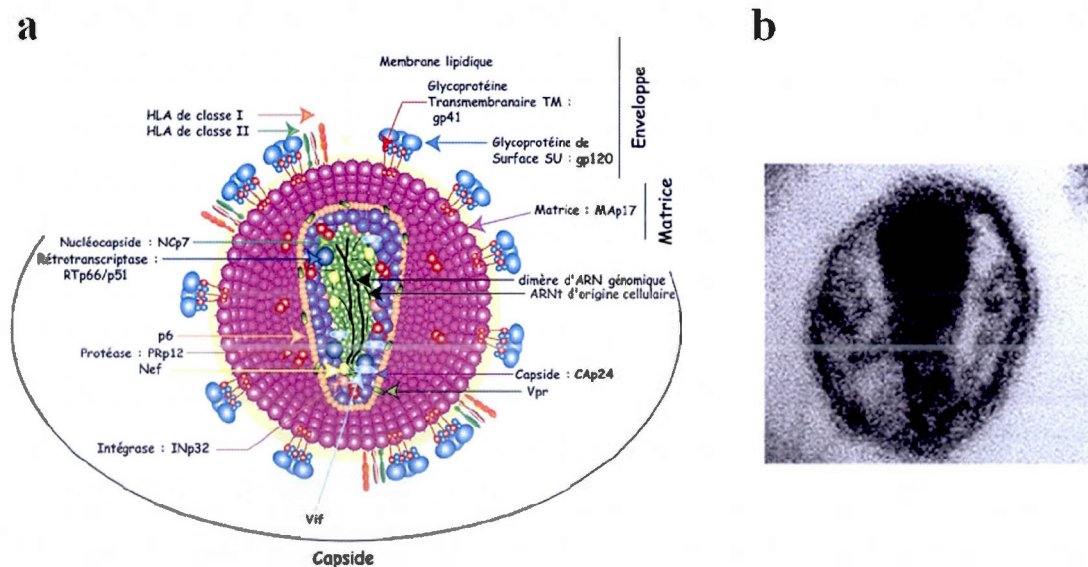


(a) L'arbre phylogénique résumant la relation d'évolution entre les lentivirus connus et la distribution des différents gènes accessoires. (b) Les lentivirus codent pour des gènes accessoires en plus des gènes essentiels gag, pol et env, retrouvés chez tous les rétrovirus. Abréviations: BIV, bovine immunodeficiency virus; EIAV, equine infectious anemia virus; FIV, feline immunodeficiency virus; HERV-K, human endogenous retrovirus K; HIV, human immunodeficiency virus; MMTV, mouse mammary tumor virus; PSIV, prosimian immunodeficiency virus; RELIK, rabbit endogenous lentivirus K; SRLV, small ruminant lentivirus; SRV-1, simian retrovirus type-1. Genes: dUTP, deoxyuridine triphosphatase; nef, negative factor; rev, regulator of virion expression; tat, trans-activator of transcription; vif, viral infectivity factor. CA, capsid; IN, integrase; MA, matrix; NC, nucleocapsid; PR, protease; RH, RNaseH; RT, reverse transcriptase; SU, surface glycoprotein; TM, transmembrane. Adapté de: (Gifford, 2012).

## 1.2 Structure et organisation génétique du VIH-1

### 1.2.1 Structure de la particule virale

La particule de VIH-1 (ou virion) a une forme sphérique de 110-130 nm de diamètre. Elle comprend, à l'extérieur, une enveloppe qui entoure une capside en forme de cône. L'enveloppe est constituée d'une bicouche lipidique, provenant de la membrane plasmique de la cellule infectée lors du bourgeonnement du virion, où sont insérées des protéines virales: une protéine de surface (gp120) et une protéine transmembranaire (gp41). L'enveloppe est tapissée de l'intérieur par des molécules de la protéine de la matrice MA. La capside est constituée d'une protéine, la CA (p24), qui forme un oligomère pour donner une structure conique à l'intérieur de laquelle se trouvent deux molécules identiques d'ARN viral entourées par la protéine de la nucléocapside NC (p7) et par d'autres constituants d'origine virale ou cellulaire (Figure 1.2).



**Figure 1.2. Structure de la particule du VIH-1.**

(a) Schéma représentant les différents composants de la particule VIH-1. (b) Image en microscopie électronique d'une particule mature de VIH-1 (Goldschmidt, 2004).

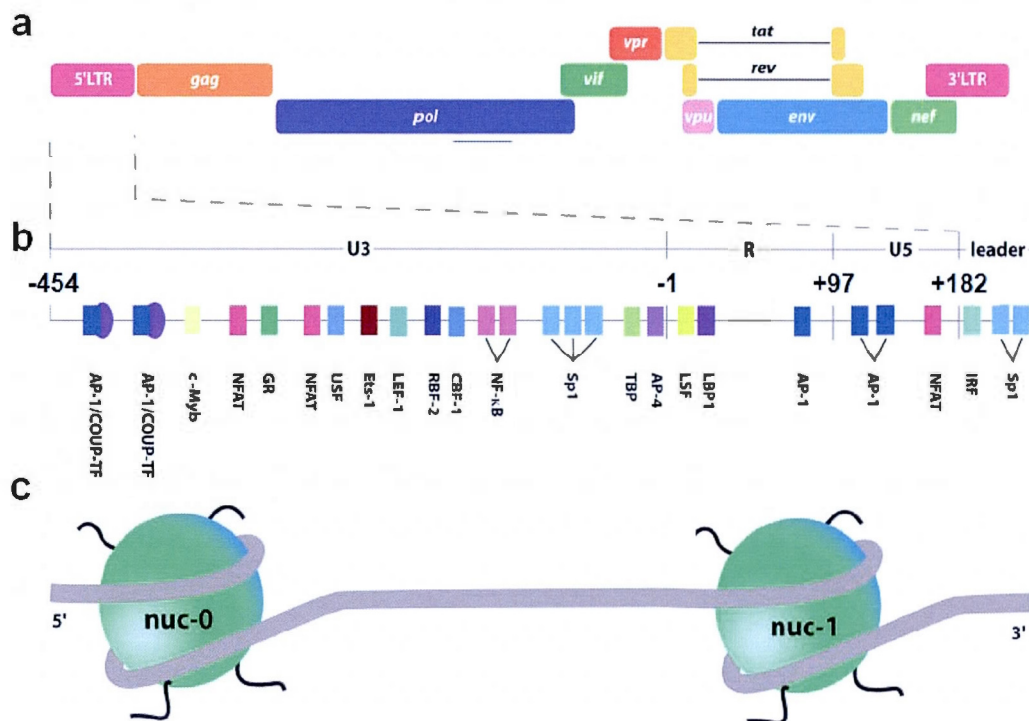


### 1.2.2 Organisation du génome

Le génome de VIH-1 est formé de deux molécules d'ARN (+) identiques d'environ 9,5 Kb chacune. L'ARN viral est rétrotranscrit en ADN double brin par la transcriptase inverse virale. L'ADN viral est constitué d'une région codante flanquée de régions non codantes.

#### 1.2.2.1 Les régions non codantes

L'ADN proviral de VIH-1 est flanqué des deux extrémités par des séquences non codantes identiques appelées LTR (*Long Terminal Repeat*). Chaque LTR est constitué de séquences U3 (*Unique* en 3'), R (*Repeat*) et U5 (*Unique* en 5'). Les deux LTR sont identiques en séquence mais ont des fonctions différentes. Le LTR en 5' exerce une action promotrice alors que le LTR en 3' spécifie le site de polyadénylation. La chromatine autour du 5' LTR du VIH-1 est organisée en cinq nucléosomes (nuc-0 à nuc-4) dont deux, nuc-0 et nuc-1, sont positionnés au niveau de la région promotrice (Easley *et al.*, 2010b). La séquence U3 (de -454 à -1) contient tous les signaux requis pour la régulation de la transcription de l'ADN viral intégré par l'ARN polymérase II cellulaire (Colin et Van Lint, 2009; Freed, 2001; La séquence U3 renferme le cœur du promoteur (-78 à -1) qui permet la transcription du génome viral à un taux basal. Il possède trois sites de fixation du facteur de transcription Sp1 et une boîte TATA. La séquence U3 renferme également le domaine activateur (-104 à -79) qui possède deux sites de liaison du facteur NF-KB et le domaine modulateur (-454 à -105) avec une séquence NRE (*Negative Regulatory Element*) qui régule de façon négative la transcription. Les séquences R (de +1 à +97), U5 (de +98 à +182) ainsi que la séquence PBS (*Primer Binding Site*) et la séquence leader, située en dehors des LTR, comportent des signaux de transactivation de la transcription (Goldshmidt, 2004) (Figure 1.3).



**Figure 1.3. L'organisation de la chromatine autour du 5' LTR du VIH-1.**

(a) Représentation du génome du VIH-1. (b) Représentation schématique des principaux sites de liaison des facteurs de transcription dans le 5' LTR du VIH-1. La transcription commence au nucléotide +1 situé à la jonction U3/R. (c) Représentation schématique de l'organisation nucléosomale de la région 5' du génome du VIH-1. L'activation de la transcription correspond à un remodelage spécifique du nucléosome nuc-1 situé en aval du site d'initiation de la transcription. Adapté de: (Colin et Van Lint, 2009).

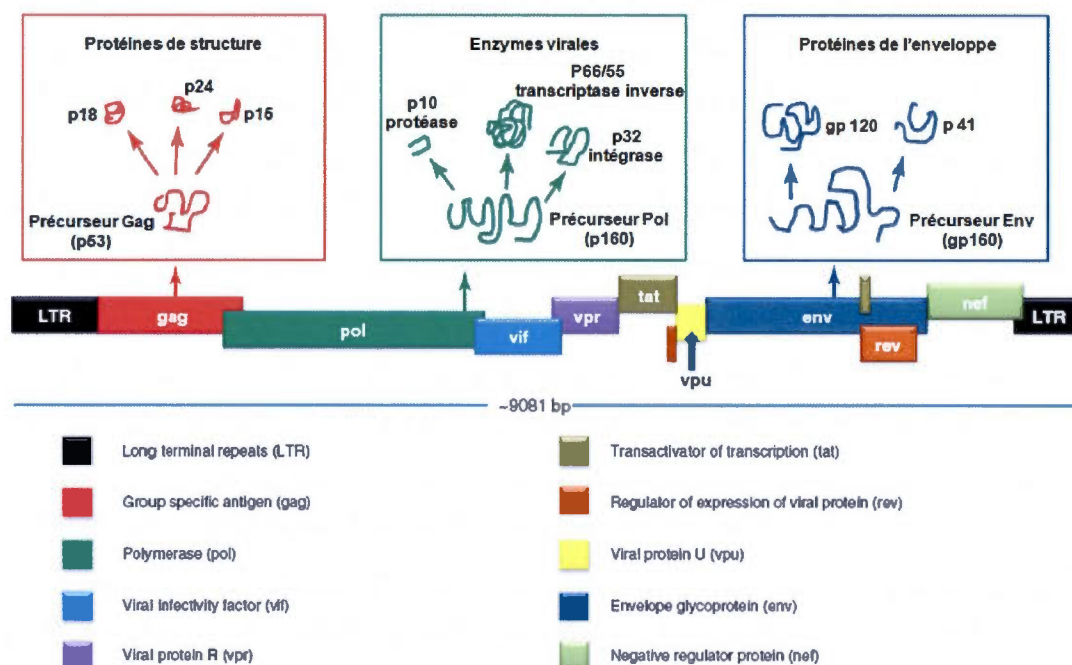


### 1.2.2.2 La région codante

Le génome de VIH-1 code pour des protéines qui sont communes à tous les rétrovirus (protéines de structure et protéines enzymatiques : Gag, Pol et Env) et pour des protéines qui sont propres aux lentivirus (protéines régulatrices et protéines accessoires: Tat, Rev, Nef, Vif, Vpu et Vpr (Figure 1.4).

**Le gène gag (pour *group-specific antigen*).** Il code pour un précurseur, Pr55<sup>Gag</sup>, dont le clivage par la protéase virale donne naissance aux protéines de la matrice MA (p17), de la capside CA (p24), de la nucléocapside NC (p7), la protéine p6 et à deux peptides d'espacement SP1 et SP2 (Freed, 2001 ; Ganser-Pornillos, Yeager et Sundquist, 2008). Il faut noter que chaque domaine ou protéine de Gag joue un rôle spécifique dans le contexte du précurseur non clivé qui est différent de son rôle une fois libéré par clivage protéolytique. Dans le précurseur, les domaines de Gag interviennent dans l'assemblage des particules virales. En revanche, ces mêmes domaines, une fois clivés, agissent plutôt durant les étapes qui suivent l'entrée du virus dans la cellule telles que la décapsidation, la formation du complexe de pré-intégration ainsi que son transport dans le noyau. Cette différence de comportement reflète des différences de structure des domaines non clivés par rapport aux domaines clivés (Klein, Reed et Lingappa, 2007).

**Le gène pol (pour *polymerase*).** Le gène pol code pour les différentes enzymes virales: la protéase PR (p10), la transcriptase inverse RT (p66/p55) et l'intégrase IN (p32) qui dérivent d'un précurseur de 160 KDa, Pr160<sup>GagPol</sup>. Celui-ci est synthétisé suite à un décalage du cadre de lecture de -1 à la jonction gag/pol durant la traduction de Gag qui se produit avec une fréquence de 5 à 10%. La protéine Pr160<sup>GagPol</sup> est empaquetée dans le virion où elle sera clivée en protéines individuelles par la protéase virale durant la maturation.



Drug Discovery Today

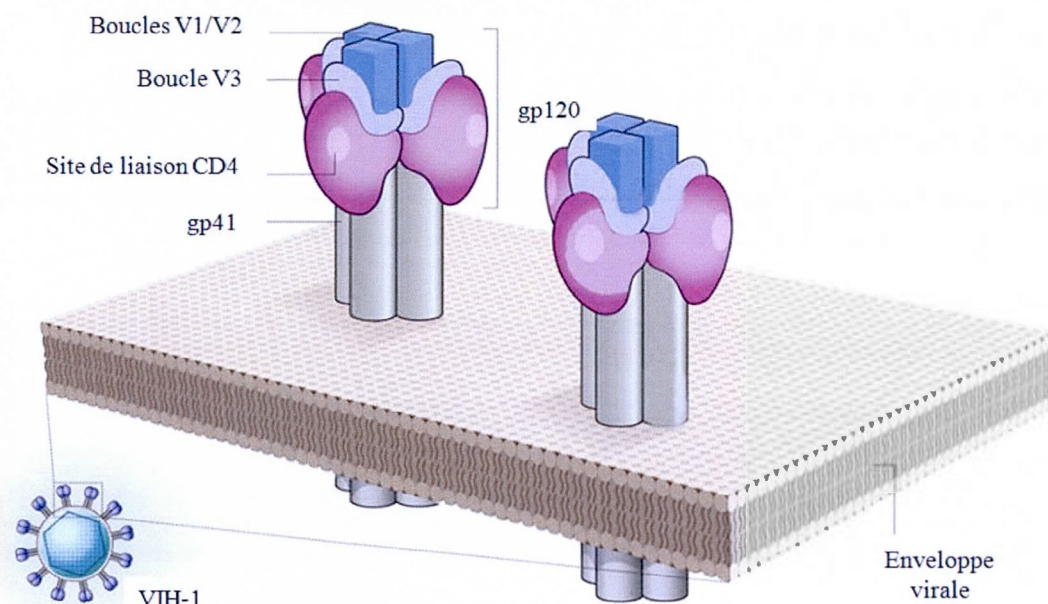
### Figure 1.4. Les gènes codés par le VIH-1.

Le génome du VIH-1 est encadré de deux séquences appelées LTR (*Long Terminal Repeat*). Les protéines virales sont synthétisées à partir de plusieurs cadres de lecture de l'ARN viral. Les précurseurs protéiques Gag et Gag-Pol sont clivés par la protéase virale au cours de la maturation alors que le précurseur Env est clivé par des protéases cellulaires. Adapté de: (Chhatbar *et al.*, 2011).

**Le gène env (pour *envelope*).** Le gène code pour un précurseur glycoprotéique de 160 KDa, gp160, qui est oligomérisé dans le réticulum endoplasmique et subit des étapes de glycosylation dans l'appareil de Golgi (Land et Braakman, 2001). La protéine gp160 est clivée durant son transport vers la surface cellulaire par des protéases cellulaires en une protéine de surface (SU), la gp120, et une protéine transmembranaire (TM), la gp41. Les deux protéines restent associées par des liaisons non covalentes en hétérodimères et sont transportées vers la membrane où elles sont incorporées, lors du bourgeonnement, dans les virions sous la forme de spicules,

chaque spicule étant formé d'un trimère d'hétérodimères (Figure 1.5). La gp120 est organisée en cinq régions constantes dont les séquences sont semblables parmi les différentes souches virales (C1-C5) et cinq régions variables qui diffèrent considérablement entre les souches, appelées boucles variables (V1-V5) (Starcich *et al.*, 1986). La structure de gp120 comprend un domaine interne et un domaine externe relié par un feuillet  $\beta$  interdomaine. Le domaine interne est proche des points de contact avec la gp41 et des extrémités N et C-terminale de la gp120. Le domaine externe est exposé à la surface et contient la majorité des chaînes glycosidiques. La gp120, contenant le domaine de liaison, interagit avec le récepteur CD4 et le corécepteur (CCR5 ou CXCR4) à la surface de la cellule cible. La gp41 comprend un domaine externe (ectodomaine) qui est impliqué dans la fusion des membranes virale et cellulaire. L'ectodomaine renferme un segment N-terminal hautement hydrophobe appelé peptide de fusion ainsi que deux régions de répétitions d'heptapeptides contigus, HR1 et HR2. La gp41 contient aussi une ancre transmembranaire et une queue cytoplasmique (Freed, 2001). La gp41 assure l'ancrage du complexe gp120/gp41 dans l'enveloppe et déclenche la fusion de l'enveloppe virale avec la membrane cellulaire au moment de l'entrée du virus.

**Les gènes codant les protéines régulatrices et les protéines accessoires.** Les protéines régulatrices du VIH-1 que nous verrons plus loin comprennent la protéine Tat (*Transactivator of transcription*) qui active la transcription de VIH-1 à partir du LTR et la protéine Rev (*Regulation of virion proteins*) qui joue un rôle majeur dans la stabilisation et le transport des ARN viraux non épissés et partiellement épissés du noyau vers le cytoplasme. Les protéines virales dites accessoires comprennent Nef (*negative effector*), Vif (*viral infectivity factor*), Vpr (*viral protein r*) et Vpu (*viral protein u*). Ces protéines, initialement considérées comme superflues, se sont avérées importantes pour l'infection virale *in vivo* et leur fonction principale serait de contrecarrer l'immunité intrinsèque (Arhel et Kirchhoff, 2010 ; Seelamgari *et al.*, 2004).



**Figure 1.5. Structure de l'enveloppe du VIH-1.**

L'enveloppe du VIH-1 porte des spicules. Chaque spicule est formé d'un trimère de la glycoprotéine de surface gp120 et de la glycoprotéine membranaire gp41. La gp120 contient les boucles variables V1/V2 et V3 et le site de liaison au récepteur CD4. Adapté de: (Clapham et Lu, 2011).

La protéine Nef était initialement considérée comme un régulateur négatif de la transcription à partir du LTR du VIH-1 mais maintenant, il est bien établi que Nef joue un rôle positif dans la pathogenèse virale. En effet, des études ont montré que les individus infectés par des virus ayant des délétions dans *nef* présentent une progression très lente de la maladie (Kirchhoff *et al.*, 1995; Salvi *et al.*, 1998).

Plusieurs fonctions ont été décrites pour Nef dont l'augmentation de l'infectivité, la modulation des voies d'activation cellulaire et l'inhibition de



l'apoptose dans les cellules T. Nef agit également en diminuant l'expression des molécules CD4 à la surface de la cellule infectée, évitant ainsi une surinfection qui conduirait à l'apoptose. La régulation à la baisse des molécules du complexe majeur d'histocompatibilité I (CMHI) par Nef permet par ailleurs aux cellules infectées d'échapper au système immunitaire (Collins *et al.*, 1998 ; Freed, 2001 ; Seelamgari *et al.*, 2004).

La protéine Vpr, en collaboration avec l'intégrase et la protéine de la matrice, joue un rôle dans le transport nucléaire du complexe de pré-intégration dans les cellules différenciées telles que les macrophages (Vodicka *et al.*, 1998). Par ailleurs, il a été rapporté que la protéine Vpr induit l'arrêt du cycle cellulaire en phase G2, probablement pour permettre la réparation de l'ADN cellulaire après l'intégration du génome viral ou l'expression et l'assemblage du virus (Freed, 2001 ; Seelamgari *et al.*, 2004). Un rôle de Vpr dans la transactivation de la transcription à partir du LTR viral a été également décrit (Vanitharani *et al.*, 2001).

La protéine Vpu accomplit deux fonctions majeures dans le cycle de réplication du VIH-1. Elle favorise la dégradation des molécules CD4 et accroît la libération des particules virales. Vpu agirait en séquestrant le facteur de restriction tetherin qui inhibe le bourgeonnement des particules virales matures et les maintient attachées à la surface de la cellule (Freed, 2001 ; Jouvenet *et al.*, 2009 ; Neil, Zang et Bieniasz, 2008 ; Seelamgari *et al.*, 2004). Vpu joue également un rôle dans l'apoptose dans les cellules T infectées (Akari *et al.*, 2001).

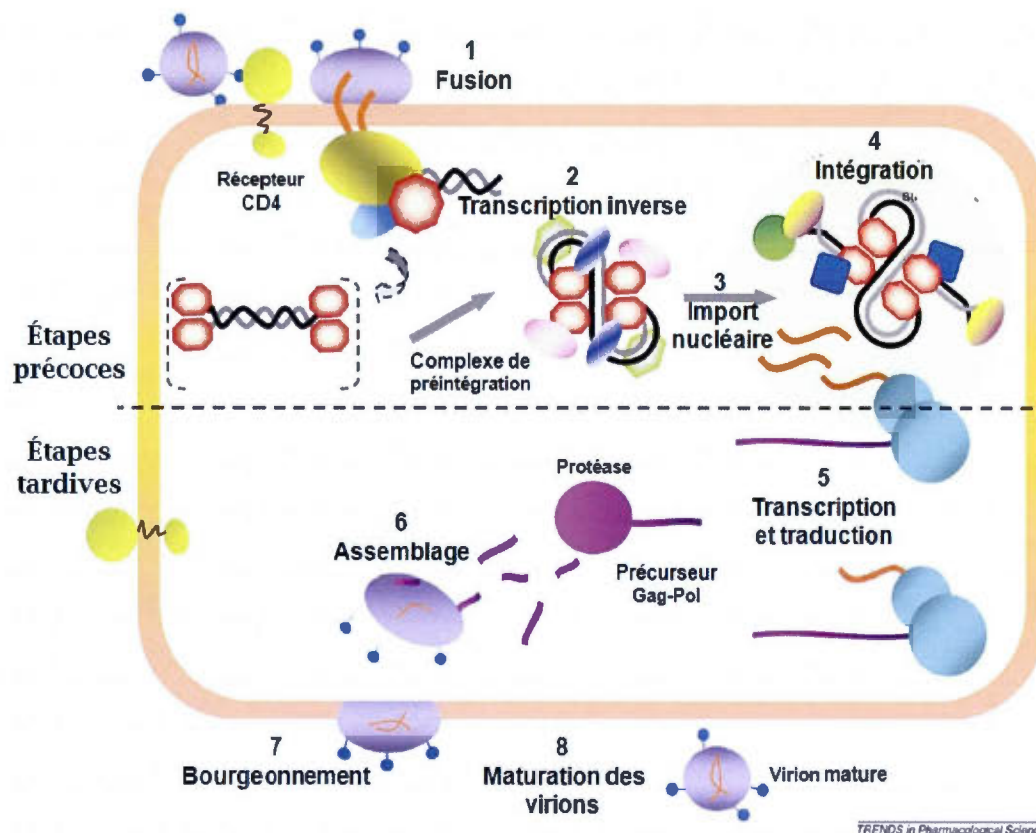
La protéine Vif est conservée parmi les lentivirus et sa mutation diminue considérablement l'infectivité virale. L'effet de Vif se manifeste dans les cellules productrices où elle bloque l'incorporation du facteur de restriction APOBEC3G dans les particules virales en facilitant sa dégradation par le protéasome (Harris, 2008 ; Nathans *et al.*, 2008).

### **1.3 Le cycle de réplication du VIH-1**

Les cellules cibles de VIH-1 sont les cellules immunitaires: les cellules T auxiliaires, les monocytes/macrophages, les cellules dendritiques et les cellules microgliales du système nerveux central. Le cycle de réplication de VIH-1 comprend plusieurs étapes qui peuvent être regroupées en deux phases: précoces et tardives (Figure 1.6).

#### **1.3.1 Les étapes précoces**

Les étapes précoces commencent par l'adsorption puis l'entrée du virus dans la cellule hôte. Après la fusion des membranes virales et cellulaires, la capside virale se retrouve dans le cytoplasme où elle est désassemblée. Ensuite, l'ARN viral est rétrotranscrit en ADN double brin qui migre vers le noyau sous forme d'un complexe de pré-intégration. A l'intérieur du noyau, l'ADN viral est intégré dans le génome cellulaire sous forme de provirus grâce à l'intégrase virale.



**Figure 1.6. Le cycle de réplication du VIH-1.**

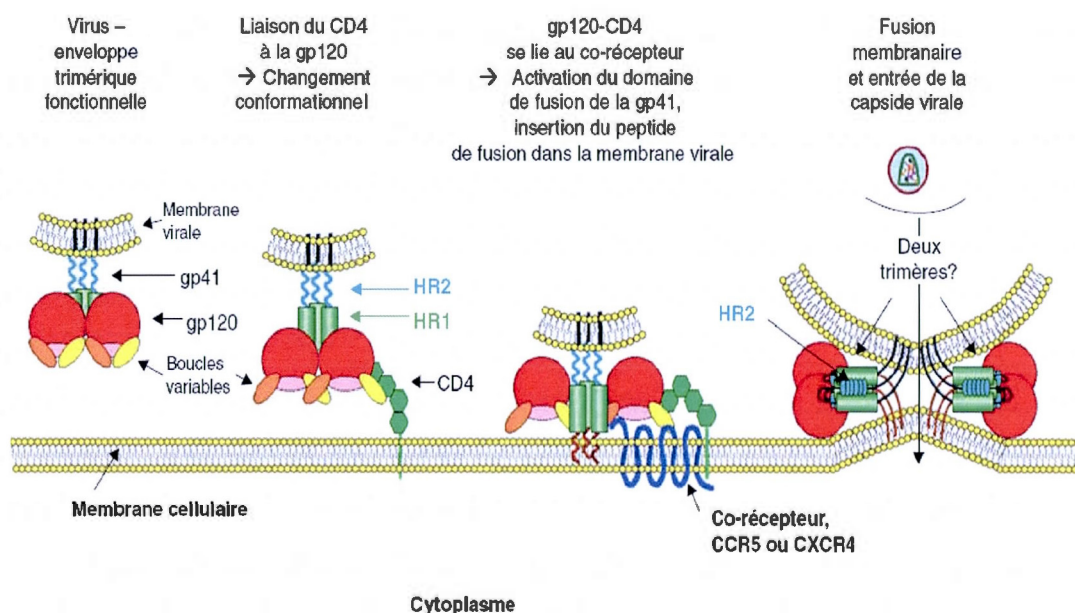
Le cycle de réplication du VIH-1 est divisé en étapes précoces et étapes tardives. Les étapes précoces comprennent la fusion du virion avec la membrane cellulaire, la transcription inverse de l'ARN viral en ADN complémentaire, l'import nucléaire de l'ADN viral et son intégration dans le génome cellulaire. Les étapes tardives consistent en la transcription à partir de l'ADN viral intégré, la traduction des transcrits, l'assemblage du virion, son bourgeonnement et finalement sa maturation pour donner un virion infectieux. Adapté de: (Al-Mawsawi et Neamati, 2007).

### 1.3.1.1 L'entrée

Comme mentionné plus haut, le VIH-1 infecte les cellules à récepteur CD4. L'infection débute par la l'attachement du virus à la surface de la cellule cible et la liaison spécifique de la glycoprotéine virale gp120 au récepteur cellulaire CD4 et aux co-récepteurs CCR5 ou CXCR4, des chimiokines qui sont présents à la surface des macrophages ou des cellules T. La liaison de la glycoprotéine gp120 au récepteur CD4 provoque des changements importants de conformation au niveau de la gp120 (Myszka *et al.*, 2000) qui déplacent les boucles variables V1/V2 et repositionnent le domaine interne pour former le feuillet inter-domaines et l'exposition du site de liaison du co-récepteur (Chen *et al.*, 2005). Des éléments de la boucle V3 et certains résidus de la région C4 participent à la formation de ce site. La liaison de la gp120 aux récepteurs entraîne l'insertion du peptide hydrophobe de fusion situé à l'extrémité N-terminale de la gp41 dans la membrane de la cellule cible. Cet évènement déclenche des réarrangements au sein de la gp41 qui impliquent les régions HR1 et HR2 du domaine externe de la gp41 conduisant au rapprochement des membranes virales et cellulaires pour la fusion et la libération du génome viral dans le cytoplasme des cellules (Colman et Lawrence, 2003 ; Eckert et Kim, 2001 ; Engelman et Cherepanov, 2012 ; Gallo *et al.*, 2003 ; Melikyan *et al.*, 2000 ; Pierson et Doms, 2003 ; Weissenhorn *et al.*, 1997) (Figure 1.7). L'attachement fait également intervenir des interactions entre des molécules à la surface de la membrane virale, provenant du virus ou de l'hôte, et des molécules de surface cellulaires. En effet, des interactions entre le virus et des molécules comme le récepteur du mannose présent sur les macrophages (Trujillo *et al.*, 2007), la molécule d'adhésion DCSIGN (*Dendritic Cell-Specific Intercellular adhesion molecule 3-Grabbing Non- integrin*) présente sur les cellules dendritiques (Curtis, Scharnowske et Watson, 1992) ou la molécule d'adhésion LFA-1 (*Lymphocytes Function-associated Antigen-1*) présente sur les lymphocytes T ont été observées (Fortin *et al.*, 1997).



Le mécanisme d'entrée mettant en œuvre la fusion de l'enveloppe virale et la membrane plasmique a longtemps été considéré comme la seule voie d'entrée du VIH-1 menant à une infection productive dans les lymphocytes T CD4+. Cependant, des études récentes ont montré que le virus peut utiliser la voie d'endocytose pour entrer dans la cellule cible (Clotet-Codina *et al.*, 2009 ; Hubner *et al.*, 2009 ; Miyauchi *et al.*, 2009). Miyauchi et ses collaborateurs (Miyauchi *et al.*, 2009) ont même proposé que la voie d'endocytose serait la voie d'entrée prédominante du VIH-1.



**Figure 1.7. Les différentes étapes de l'entrée du VIH-1 dans la cellule cible.**

La gp120 en se liant au récepteur CD4 et au co-récepteur subit des changements de conformation qui permettent au peptide de fusion de la gp41 de s'insérer dans la membrane de la cellule cible. La gp120 se dissocie du complexe et la gp41 subit d'autres transformations qui conduisent au faisceau d'hélices. La formation du faisceau de 6 hélices permet la fusion complète des deux membranes et la libération du génome viral dans le cytoplasme des cellules (Pancera, 2005).

### 1.3.1.2 La décapsidation et le transport cytoplasmique

Après la fusion, la capsid du virus est libérée dans le cytoplasme de la cellule hôte où un processus de décapsidation (*uncoating*) donne naissance à un complexe de rétrotranscription (RTC) puis à un complexe de préintégration (PIC). Grâce à un marquage fluorescent de l'intégrase virale, il a été possible de montrer que la capsid virale est transportée jusqu'au noyau en utilisant le réseau des microtubules et les filaments d'actine (Arhel *et al.*, 2006 ; Li *et al.*, 2000). Au voisinage de la membrane nucléaire, le core du virus se détache des filaments d'actine pour s'associer aux pores nucléaires par le biais de nucléoporines (Arhel *et al.*, 2006). Initialement, il a été proposé que la décapsidation du VIH-1 commence immédiatement après son entrée dans la cellule. Cependant, des études de microscopie électronique à balayage ont ultérieurement suggéré que le virus perd sa capsid juste avant l'entrée dans le noyau (Arhel, 2010 ; Arhel *et al.*, 2007). Par ailleurs, des travaux ont montré qu'une décapsidation hâtive du virus diminue l'efficacité de la transcription inverse probablement à cause de la diffusion dans le cytoplasme de la transcriptase inverse, déjà présente en faible nombre (80 à 120 copies) dans le virion (Arhel and Chameau, 2009 ; Perron *et al.*, 2007 ; Stremlau *et al.*, 2006). Il semble que la décapsidation, ayant lieu au niveau du pore nucléaire, coïncide avec la terminaison de la transcription inverse qui produit une structure à trois brins dans l'ADN viral (ADN Flap central) et que la formation de l'ADN Flap induirait une gêne stérique conduisant au désassemblage de la capsid (Arhel, 2010).

### 1.3.1.3 La transcription inverse

Dans le RTC, l'ARN viral est rétrotranscrit en ADN double brin par la transcriptase inverse virale qui possède des activités ADN polymérase ARN- et ADN-dépendante et ribonucléase H (RNase H). Également, la protéine virale NC laquelle, de par son rôle de chaperon de l'ARN viral, intervient tout le long de la synthèse de l'ADN viral (Darlix *et al.*, 2011). La réaction de la transcription inverse

se déroule en une série d'étapes qui utilisent des éléments cis-régulateurs dans le génome viral, (pour revue : Freed, 2001 ; Sarafianos *et al.*, 2009) (Figure 1.8).

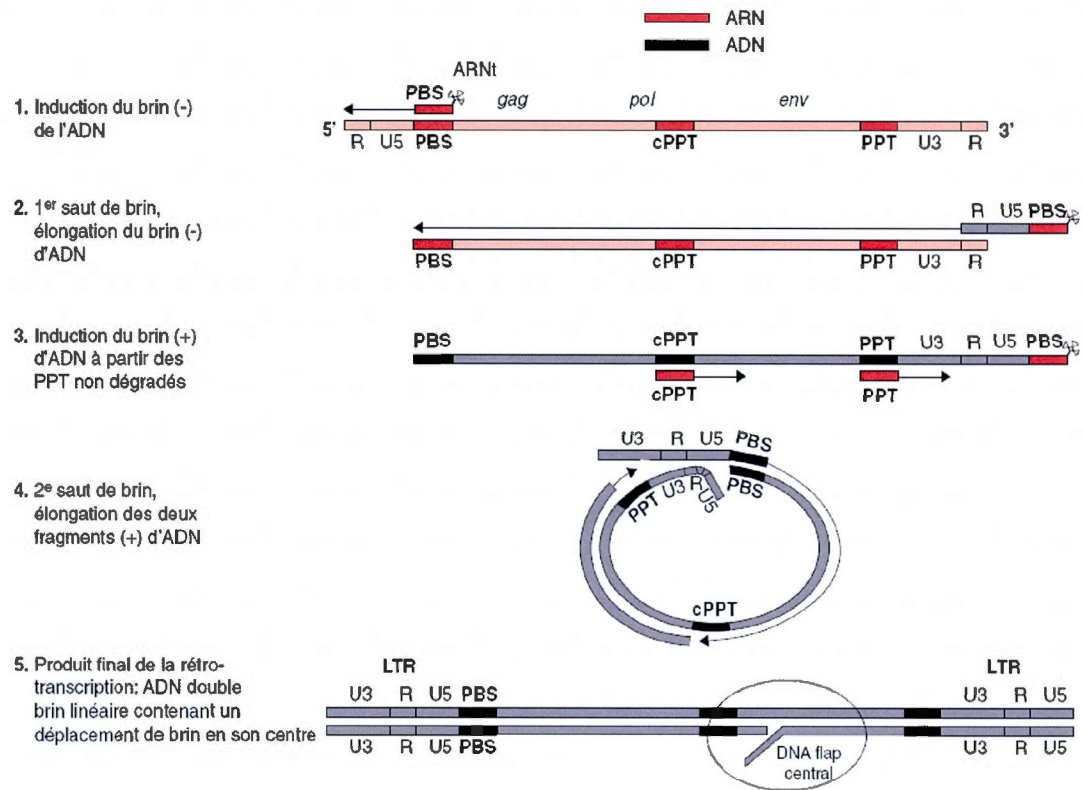
La transcription inverse est initiée par l'utilisation comme amorce d'un ARNt<sub>3</sub><sup>Lys</sup> cellulaire dont les 18 derniers nucléotides (du côté 3') sont complémentaires à une séquence appelée pbs (*primer binding site*), proche de l'extrémité 5' du génome viral. La synthèse d'ADN conduit à l'élongation de l'extrémité 3' de l'amorce jusqu'à l'extrémité 5' de l'ARN viral donnant naissance à un complexe hybride ADN/ARN. Le fragment d'ARN rétrotranscrit (RU5) est ensuite dégradé par l'activité RNase H de la transcriptase inverse et un fragment d'ADN, appelé brin négatif "*strong stop*" contenant les séquences R et U5, est généré.

Dans une étape dite de transfert de brin, le brin négatif d'ADN effectue un saut de l'extrémité 5' à l'extrémité 3' de l'ARN viral en utilisant l'homologie de séquence de la région R. Le long brin négatif d'ADN est synthétisé, en se servant de l'extrémité 3' de l'ADN "*strong stop*" comme amorce. En même temps, l'ARN du complexe ADN/ARN est dégradé par l'activité RNase H de la transcriptase inverse et seules deux séquences riches en purines (*polypurine tract*: PPT) résistent à l'activité RNase : l'une du côté 3' et l'autre au centre du génome (cPPT). Les séquences PPT et cPPT servent d'amorces pour la synthèse du brin positif de l'ADN. La synthèse continue jusqu'au 19<sup>ème</sup> avant dernier nucléotide de l'ARNt<sub>3</sub><sup>Lys</sup> dont la base A modifiée ne peut être copiée par la RT. L'ARNt lié à la séquence pbs est éliminé par l'activité RNase H, permettant ainsi le deuxième transfert de brin et l'appariement des séquences pbs présentes sur les extrémités des brins d'ADN positif et négatif. La synthèse du brin positif continue jusqu'au signal de terminaison central (*Central Termination Signal*) près du centre du génome. La séquence cPPT initie la synthèse d'un court fragment d'ADN et provoque le déplacement d'environ 100 nucléotides du brin positif, créant une structure appelée ADN Flap central. A l'issue de l'étape de

transcription inverse, le génome viral se présente sous la forme d'une copie unique d'ADN double brin avec deux LTR (séquence U3-R-U5) identiques à chaque extrémité.

Les transferts de brin survenant durant la transcription inverse donnent lieu à des phénomènes de recombinaison entre les deux molécules d'ARN génomique contenues dans le virion VIH-1. Ainsi, la transcription inverse peut générer une molécule d'ADN recombinante si, dans un virion particulier, les molécules d'ARN ne sont pas parfaitement identiques, ce qui est d'ailleurs très fréquent dans le cas du VIH-1 (Freed, 2001 ; Sarafianos *et al.*, 2009). Par ailleurs, le taux élevé de mutations ( $3 \times 10^{-5}$  par cycle de réplication) introduites par la transcriptase inverse donne naissance à une population de virions génétiquement hétérogène (Freed, 2001 ; Mansky et Temin, 1995). C'est cette variabilité de séquence qui permet au VIH-1 d'échapper au système immunitaire et de développer rapidement une résistance aux anti-viraux.

La transcription inverse est inhibée par le facteur de restriction cellulaire APOBEC3G (*APOB mRNA-Editing enzyme Catalytic polypeptide 3G*), une cytidine désaminase qui empêche l'élongation et introduit des hypermutations léthales par la conversion des cytidines en uracils dans l'ADN viral (Bishop *et al.*, 2008 ; Guo *et al.*, 2006 ; Harris *et al.*, 2003 ; Mangeat *et al.*, 2003). Pour contrer l'action de la protéine APOBEC3G, la protéine virale Vif empêche son incorporation dans la particule virale et entraîne sa dégradation ubiquitin-dépendante dans les cellules productrices (Sheehy, Gaddis et Malim, 2003 ; Yu *et al.*, 2003). La protéine Vif semble aussi inhiber l'expression d'APOBEC3G au niveau traductionnel en se liant à l'ARNm de celle-ci (Stopak *et al.*, 2003).



**Figure 1.8. Les étapes de la transcription inverse de l'ARN génomique du VIH-1 en ADN double brin (Jacquot et Benichou, 2006).**



#### 1.3.1.4 L'import nucléaire

Contrairement aux autres rétrovirus, le VIH-1, un lentivirus, est capable de d'infecter les cellules qui ne sont pas en division notamment les cellules T quiescentes, les macrophages et les cellules dendritiques. Ceci est rendu possible grâce à un import nucléaire actif du génome viral lui permettant de traverser la membrane nucléaire. Plusieurs déterminants viraux ont été suggérés comme participant à l'import nucléaire de l'ADN du VIH-1 (faisant partie du PIC) dont l'ADN Flap central et également des protéines virales MA, Vpr et l'intégrase qui possèdent des propriétés karyophiles. Il a été proposé que ces protéines, renfermant des signaux de localisation nucléaire, soient reconnues par les importines  $\alpha$  (imp $\alpha$ ) lesquelles interagissent avec les importines  $\beta$  (imp $\beta$ ). Le transport du complexe PIC/ imp $\alpha$ / imp $\beta$  ainsi formé à travers le pore nucléaire met en jeu des interactions entre les nucléoporines qui constituent le pore et les imp $\beta$ . Une fois dans le noyau, la protéine Ran liée au GTP se lie à l'imp $\beta$  et induit la dissociation du complexe et la libération du PIC (Suzuki et Craigie, 2007). L'importance de cette voie d'import nucléaire dans le transport du PIC du VIH-1 n'est pas établie et d'autres voies mettant en jeu l'interaction directe des constituants du PIC notamment celle de l'intégrase avec les nucléoprines ont été suggérées (Suzuki et Craigie, 2007 ; Zaitseva *et al.*, 2009). Des facteurs cellulaires tels que les protéines FEZ1 (*fasciculation and elongation protein zeta-1*), Nup98, Nup358, Nup153, l'importine 7 et la transportine 3/transportin SR-2 interviennent également pour faciliter le passage du PIC à travers le pore nucléaire (Christ *et al.*, 2008 ; Ebina *et al.*, 2004 ; Fassati *et al.*, 2003 ; Naghavi *et al.*, 2005).

#### 1.3.1.5 L'intégration

L'intégration de l'ADN rétroviral dans le génome de la cellule hôte aboutit à la formation d'un provirus capable de se répliquer. La réaction est catalysée par l'intégrase qui reconnaît des séquences spécifiques dans les régions LTR (*long*

*terminal repeat*) de l'ADNc viral. L'intégration se déroule en deux étapes: l'élimination de deux nucléotides des deux extrémités 3' de l'ADN viral (clivage en 3') et la jonction covalente de ces extrémités 3'-OH avec les extrémités 5' nouvellement créées dans l'ADN cellulaire (transfert de brin). La réparation de l'ADN cellulaire après l'intégration est catalysée par des enzymes cellulaires. La réaction d'intégration implique de nombreux facteurs cellulaires à travers leur interaction avec l'intégrase. La réaction d'intégration ainsi que les partenaires d'interaction de l'intégrase seront détaillés dans les parties 1.4 et 1.5.

### **1.3.2 Les étapes tardives**

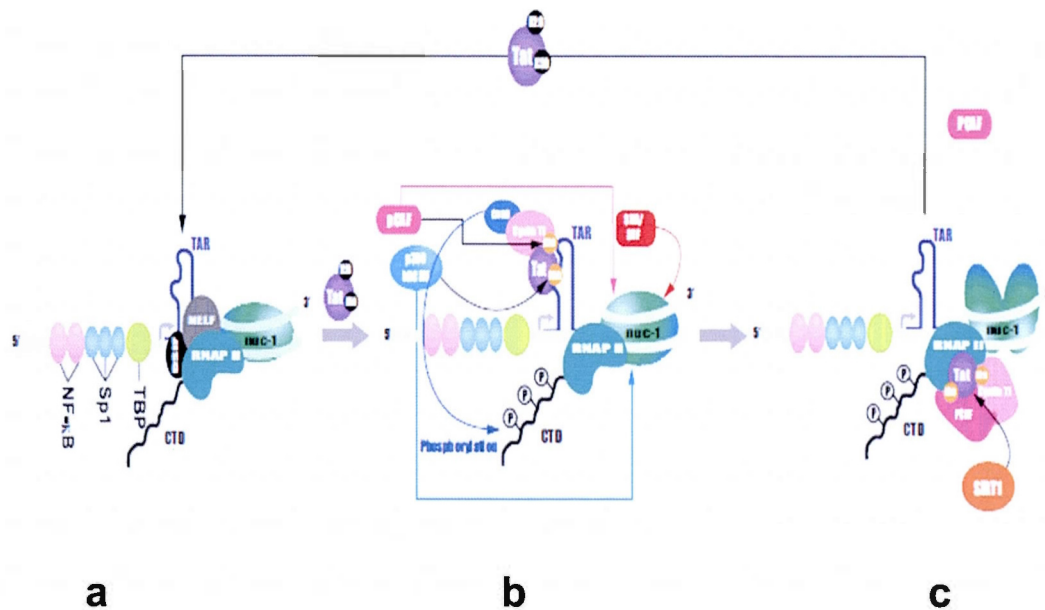
Suite à l'intégration, le provirus est transcrit par la machinerie cellulaire en ARNs viraux qui vont subir ou non un épissage. Les ARNs sont transportés vers le cytoplasme où ils seront traduits en protéines ou servir d'ARNs génomiques. Les constituants viraux (ARNs et protéines) et certaines protéines cellulaires sont assemblés au niveau de la membrane plasmique d'où ils seront libérés sous forme de virions par bourgeonnement. Juste après leur libération, les particules virales subissent une maturation durant laquelle les précurseurs Gag et GagPol sont clivés par la protéase virale en protéines individuelles. La maturation met en œuvre une série de réarrangements structuraux qui se traduisent par un changement de la morphologie du cœur du virus qui passe d'une forme arrondie en une forme conique.

#### **1.3.2.1 La transcription**

Une fois intégré, le provirus est capable de s'exprimer dans la cellule hôte où il sert de matrice pour la transcription de l'ARN viral. Pour sa propre transcription, le virus utilise l'ensemble de la machinerie cellulaire, mais la protéine virale Tat augmente considérablement l'efficacité du processus. La transcription débute à la jonction U3/R située dans le LTR 5' et prend fin en 3' de la séquence R contenue dans le LTR 3' (Freed, 2001; Goldschmidt, 2004). La région U3 du LTR 5' renferme



les éléments en *cis* nécessaires au positionnement de l'ARN polymérase II (pol II) au niveau du site d'initiation de la transcription. La transcription basale à partir du LTR est bloquée à l'étape d'élongation, à cause de l'association du facteur N-TEF (*Negative Transcription Elongation Factor*). Ainsi, de courts transcrits s'accumulent dans le cytoplasme. Néanmoins, une quantité minimale d'ARN viral pleine longueur permet l'expression de la protéine Tat (Colin et Van Lint, 2009) qui favorise aussi bien l'initiation que l'élongation de la transcription à partir de l'ADN viral. Tat agit sur un élément de l'ARN appelé TAR (Transactivation Reponse Region), situé à l'extrémité 5' des ARNs viraux naissants, et qui consiste en une structure tige-boucle avec une protubérance formée de nucléotides non appariés (Berkhout et Jeang, 1989 ; Freed, 2001). Tat active la transcription en recrutant le complexe protéique p-TEF-b (*Positive-Transcriptional Elongation Factor b*), composé essentiellement des protéines cellulaires cycline T1 et CDK9 (Wei *et al.*, 1998). Le recrutement du complexe p-TEF-b à l'élément TAR a pour conséquence la phosphorylation du domaine C-terminal de l'ARN polymérase II et la stimulation de l'élongation du transcrit viral. L'acétylation de Tat par PCAF (*CBp/p300-associated factor*) favorise son interaction avec p-TEF-b et sa dissociation du N-TEF. Par la suite, la phosphorylation de Tat par p300 et Gcn5 entraîne la libération de pTEFb, la dissociation de Tat et TAR et le transfert de l'ARN viral sur le complexe d'élongation. Tat recrute aussi PCAF et des complexes de remodelage de la chromatine pour améliorer l'élongation de la transcription par pol II. Finalement, la désacétylation de Tat par l'histone désacétylase Sirtuin 1 permet la libération de Tat qui devient ainsi disponible pour de nouveaux cycles d'activation de la transcription (Colin et Van Lint, 2009) (Figure 1.9).



**Figure 1.9. L'activation de la transcription par la protéine virale Tat.**

(a) En l'absence de Tat, la transcription à partir du LTR est bloquée à l'étape d'élongation et de courts ARNms sont produits. (b) Suite à la synthèse des premières molécules de Tat, cette protéine migre vers le noyau et se lie à la séquence TAR sur l'ARN viral naissant. Tat active la transcription en recrutant le facteur d'élongation pTEFb, composé de CyclT1 et Cdk9 qui phosphoryle le domaine CTD de la RNAPII, et active l'élongation de la transcription. Ce recrutement est favorisé par l'acétylation de Tat par PCAF. L'acétylation de Tat par p300 et Gcn5 entraîne sa dissociation de TAR et le transfert de l'ARN viral au complexe d'élongation. (c) A la fin de l'élongation, Tat est désacétylée par la Sirtuin 1, entraînant sa libération pour initier de nouveaux cycles d'activation de la transcription (Colin et Van Lint, 2009).

### 1.3.2.2 La régulation de la transcription et la latence virale

Après son intégration, l'ADN du VIH-1 peut rester dans un état latent pendant de longues périodes ou être amené à s'exprimer activement. Le phénomène de la latence virale a été décrit à la suite des observations mettant en évidence une réémergence rapide de la virémie après l'arrêt des thérapies antirétrovirales, même chez les patients ayant eu une observance stricte du traitement pendant de nombreuses années. Ce rebond de la virémie a été expliqué par une réactivation de l'expression du virus (Chun *et al.*, 1995 ; Finzi *et al.*, 1997 ; Piatak *et al.*, 1993 ; Wong *et al.*, 1997). La latence du VIH-1 peut s'établir principalement dans les cellules T CD4<sup>+</sup> en repos mais aussi dans les macrophages/monocytes et les cellules dendritiques (Barber *et al.*, 2006 ; Keele *et al.*, 2008). Étant donné qu'elles n'expriment pas de protéines virales, ces cellules échappent au système immunitaire ainsi qu'aux thérapies antirétrovirales et constituent de ce fait des réservoirs pour le virus (Colin et Van Lint, 2009 ; Graci *et al.*, 2009). Dans le cas des cellules T CD4<sup>+</sup>, il semble acquis que la mise en place de la latence se fait dans des cellules activées qui retournent à l'état de repos, rejoignant le groupe des cellules T CD4<sup>+</sup> mémoires ou dans les cellules en différenciation durant la thymopoïèse (Cherrier *et al.*, 2010 ; Colin et Van Lint, 2009 ; Margolis, 2010 ; Schwartz *et al.*, 2010). Les cellules T CD4<sup>+</sup> mémoires ont une demi-vie moyenne de 44,2 mois et selon certaines estimations, l'éradication d'un réservoir constitué de 10<sup>6</sup> cellules nécessiterait 60 ans de traitement non interrompu aux anti-rétroviraux (Cherrier *et al.*, 2010 ; Pierson, McArthur et Siliciano, 2000). La persistance des cellules réservoirs du VIH-1 représente donc un obstacle majeur à l'éradication du virus.

Les mécanismes sous-jacents à l'établissement et la maintenance de la latence ne sont pas bien caractérisés mais il est évident que plusieurs éléments cellulaires et viraux sont impliqués tels que la protéine virale Tat, le site d'intégration, l'inhibition de l'expression virale par les microARNs, l'état d'activation de la cellule et la

disponibilité des facteurs de transcription ainsi que l'état de condensation de la chromatine au niveau du promoteur viral (Colin et Van Lint, 2009). La transcription à partir du LTR viral dépend largement de l'état de condensation local de la chromatine autour des nucléosomes nuc-0 et nuc-1, situés au niveau de la région promotrice (Easley *et al.*, 2010b). En général, une chromatine condensée ou hétérochromatine est associée à une répression de la transcription. En revanche, la structure ouverte de l'euchromatine facilite l'accès à la machinerie transcriptionnelle et permet la transcription des gènes viraux (Craig, 2005 ; Yang et Seto, 2007).

L'état de la chromatine est modulé par des mécanismes de remodelage ATP-dépendants ainsi que par les modifications post-traductionnelles des résidus lysine sur les histones H3 et H4. Ces modifications peuvent être de cinq types: acétylation, méthylation, phosphorylation, sumoylation et ubiquitinylation. De plus, la combinaison de ces modifications constitue un "code histone" qui sert à recruter de manière spécifique des complexes protéiques impliqués dans la régulation de l'expression génique. Ceci se traduit finalement en un état actif ou inactif de la chromatine (Colin et Van Lint, 2009 ; Margolis, 2010).

Il est établi que la désacétylation des histones par les histones désacétylases (HDACs) induit la condensation de la chromatine qui sera alors transcriptionnellement inactive, alors que l'acétylation par les histones acétyltransférases (HAT) produit l'effet inverse (Yang et Seto, 2007). Des études ont montré que les protéines HDACs notamment HDAC1, HDAC2 et HDAC3 étaient recrutées au LTR du VIH-1 dans les lignées cellulaires servant à modéliser la latence virale (Coull *et al.*, 2000 ; Imai et Okamoto, 2006 ; Jiang *et al.*, 2007 ; Keedy *et al.*, 2009 ; Marban *et al.*, 2007 ; Tyagi et Karn, 2007 ; Williams *et al.*, 2006). En effet, plusieurs facteurs de transcription semblent pouvoir recruter de façon plus ou moins redondante les HDACs au 5'LTR du VIH-1. C'est notamment le cas des facteurs LSF (*Late SV40 factor*), YY1 (*Ying Yang 1*), AP-4 (*Activating protein-4*), NF- $\kappa$ B p50/p50,



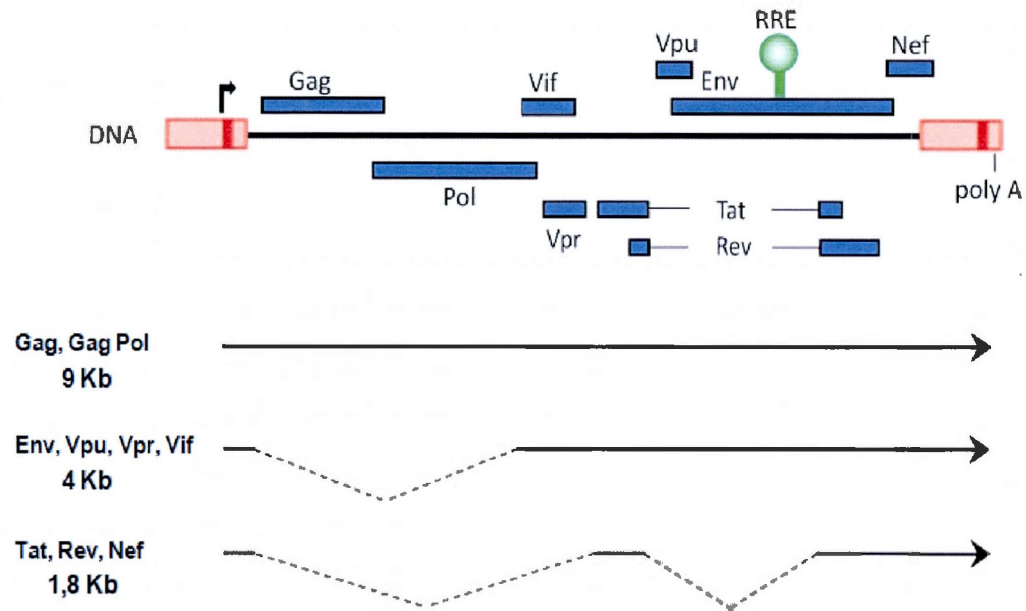
CBF-1 (*C-promoter Binding Factor 1*), RBF-2 (*Ras-responsive Binding Factor 2*), Sp1 (*specificity protein 1*) et le récepteur de l'hormone thyroïdienne (Colin et Van Lint, 2009). Par ailleurs, les inhibiteurs des HDACs se sont révélés capables d'induire l'expression du VIH-1 dans les modèles cellulaires de latence ainsi que dans les cellules T CD4<sup>+</sup> au repos obtenues de patients avirémiques (Archin *et al.*, 2009 ; Ylisastigui *et al.*, 2004).

La réactivation de l'expression du VIH-1 par les inhibiteurs des HDACs, ou en réponse à d'autres stimuli (interleukines, TNF $\alpha$ , esters de phorbol, activation par la protéine Tat), se traduit par le recrutement des histones acétyltransférases notamment CBP/p300 et pCAF (*CBp/p300-associated factor*) ainsi que des complexes de remodelage de la chromatine, SWI/SNF, au LTR du VIH-1. Ce recrutement conduit à l'acétylation des histones et au remodelage du nucléosome nuc-1 qui est situé directement en aval du site d'initiation de la transcription. Il s'ensuit une ouverture de la chromatine qui devient alors accessible à la machinerie de transcription et une activation de l'expression virale (Colin et Van Lint, 2009). Les acétyltransférases CBP/p300 et pCAF peuvent également modifier la protéine Tat sur les résidus lysine 50 et 80, respectivement. L'acétylation de Tat par pCAF augmente son interaction avec le complexe P-TEF-b alors que l'acétylation par p300 induit la libération de Tat du complexe Tat/P-TEF-b et son transfert sur le complexe d'élongation, avec pour conséquence l'activation de la transcription (Kaehlcke *et al.*, 2003 ; Kiernan *et al.*, 1999).

### 1.3.2.3 L'export des ARNs viraux

La transcription du provirus VIH-1 conduit à la synthèse de trois espèces d'ARNm : des ARN non épissés ( $\approx$  9kb) qui servent comme ARN génomique et à la synthèse des précurseurs Gag et Gag-Pol, des ARNm partiellement épissés ( $\approx$  4kb) qui codent pour le précurseur des protéines de l'enveloppe, la gp160, et pour les protéines vif, vpu et vpr et des ARNm complètement épissés (1,7- 2kb) qui codent

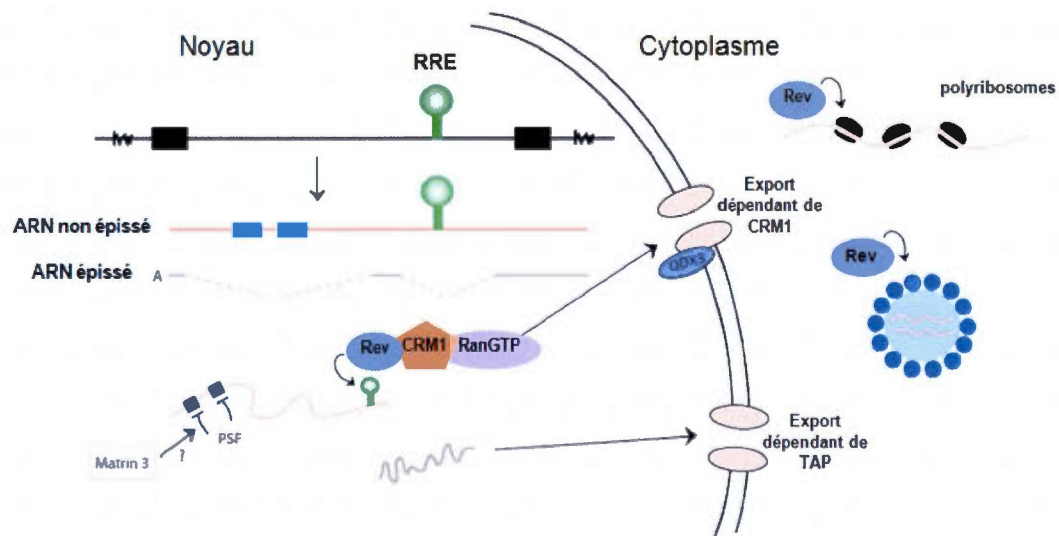
pour les protéines Rev, Nef et Tat (Freed, 2001; Renault et al., 2008) (Figure 1.10). Les ARNm viraux entièrement épissés empruntent les voies d'export cellulaire classiques. En revanche, pour l'export nucléaire des ARNm viraux non épissés ou partiellement épissés, des mécanismes particuliers qui impliquent la protéine virale Rev sont mis en œuvre (Figure 1.11). Cette protéine possède un domaine NLS (*Nuclear Localization Signal*) ainsi qu'un domaine NES (*Nuclear Export Signal*). Elle contient également un domaine de liaison à l'ARN riche en arginines qui lie spécifiquement une structure en tiges-boucles nommée RRE (*Rev Responsive Element*) présente au niveau du gène *env* sur les ARNm viraux non épissés et partiellement épissés (Freed, 2001). Une fois synthétisée, Rev est importée dans le noyau où elle se lie puis se multimérise sur la séquence RRE, conduisant à la formation d'un large complexe nucléoprotéique et l'exposition de la séquence NES de Rev. Ceci va permettre à Rev d'interagir avec l'exportine 1, également appelée CRM1 (*Chromosome Region Maintenance 1*), et finalement le transport du complexe ribonucléoprotéique vers le cytoplasme où les ARNs viraux sont traduits ou encapsidés. Les ARNm du VIH-1 contiennent également des éléments *in cis* au niveau des gènes *gag*, *pol* et *env* qui empêchent leur export nucléaire en l'absence de Rev (Maldarelli, Martin et Strebel, 1991 ; Rosen *et al.*, 1988).



**Figure 1.10. Représentation schématique du génome du VIH-1 et les ARNs épissés et non épissés.**

Les cadres de lecture ouverts et la position de la séquence RRE (*Rev-responsive element*; vert) sont indiqués en haut. En bas, les lignes représentent l'ARN non épissé (9 Kb), les ARNs partiellement épissés (4 Kb) et complètement épissés (1,8 Kb) (Jeang, 2012).





**Figure 1.11. L'export des ARNm non épissés et partiellement épissés du VIH-1.**

Les ARNs du VIH-1 non/partiellement épissés (rouge) renferment des séquences d'instabilité et une séquence RRE (*Rev Responsive Element*). Les ARNs complètement épissés (brun) ne contiennent pas ces séquences. Les ARNs non/partiellement épissés sont exportés *via* une voie dépendante de CRM1 et les ARNs complètement épissés *via* une voie dépendante de TAP. Des facteurs nucléaires (ex. PSF) qui se lient aux séquences d'instabilité retiennent les ARNs non/partiellement épissés dans le noyau. Rev se lie à la séquence RRE et le complexe Rev/CRM1/RanGTP coopère avec une protéine cellulaire, DDX3, pour l'export des ARNs non/partiellement épissés à travers les pores nucléaires. Dans le cytoplasme, Rev favorise la traduction des ARNs viraux et est enpaquetée dans les particules virales. Adapté de: (Jeang, 2012).

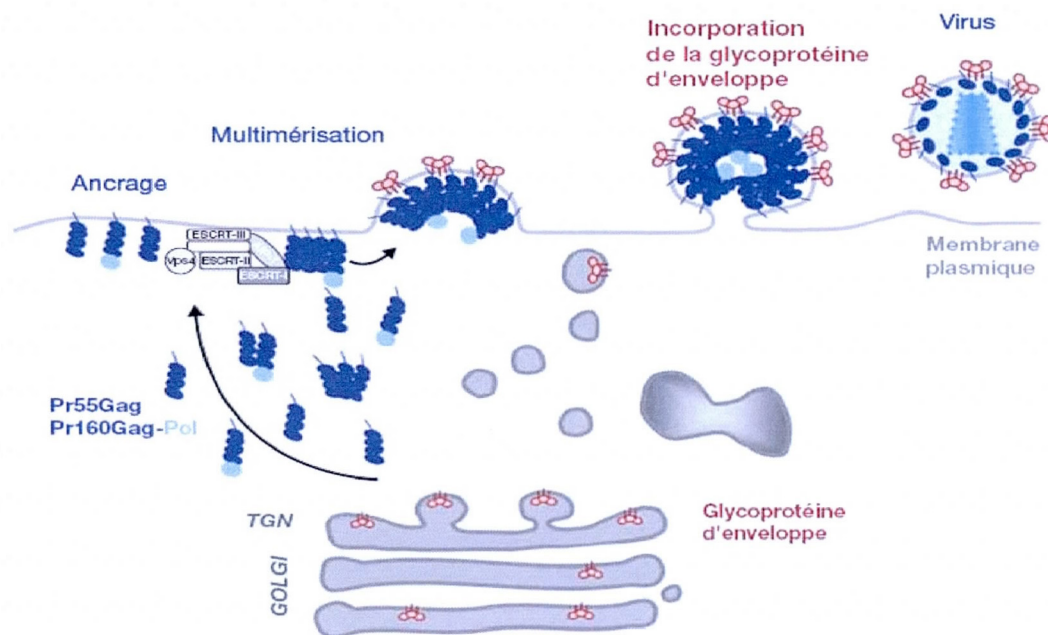
#### 1.3.2.4 L'assemblage

Les constituants viraux (ARN et protéines) et certaines protéines cellulaires sont assemblés au niveau de la membrane plasmique d'où ils seront libérés sous forme de virions par bourgeonnement. La protéine clé dans ce processus est la protéine Pr55<sup>Gag</sup> qui orchestre toutes les étapes de l'assemblage d'une particule virale à savoir l'acheminement des monomères Gag, leur multimérisation et leur assemblage en capside immature, l'encapsidation de l'ARN viral et l'incorporation de l'enveloppe ainsi que le recrutement des facteurs cellulaires pour être incorporés dans la particule virale (Ganser-Pornillos, Yeager et Sundquist, 2008) (Figure 1.12).

##### **L'acheminement de la protéine Gag et sa liaison à la membrane plasmique.**

L'assemblage des virions de VIH-1 se produit majoritairement au niveau de la membrane plasmique dans les lymphocytes T ainsi que dans les lignées cellulaires. Dans les macrophages par contre, l'assemblage semble avoir lieu principalement dans les compartiments intracellulaires, endosomes tardifs et corps multivésiculaires (LE/MVB, pour *late endosomes et multivesicular bodies*). C'est le domaine MA de Gag qui est, en grande partie, responsable de l'acheminement de Gag et sa liaison à la membrane plasmique grâce à l'insertion de son groupement myristate dans la bicouche lipidique et l'interaction des résidus basiques avec les phospholipides membranaires en particulier le PI(4,5)P2 (Ganser-Pornillos, Yeager et Sundquist, 2008). La liaison de Gag à la membrane plasmique ou à la membrane des LE/MVB dépendamment du type cellulaire serait due à la différence d'expression de certains facteurs tels que les molécules du complexe majeur d'histocompatibilité II (MCH-II) (Finzi *et al.*, 2006), la sous-unité  $\delta$  du complexe AP-3 (Dell'Angelica *et al.*, 1999 ; Le Borgne *et al.*, 1998 ; Rous *et al.*, 2002) ou l'annexine (Klein, Reed et Lingappa, 2007; Ryzhova *et al.*, 2006). Plusieurs études ont révélé une localisation préférentielle de Gag dans des micro-domaines de la membrane plasmique riches en sphingolipides et

en cholestérol qui ressemblent aux radeaux lipidiques (Ding *et al.*, 2003 ; Ono et Freed, 2001).



**Figure 1.12. L'assemblage des particules virales.**

Après leur synthèse au niveau du cytoplasme, les précurseurs Gag et Gag-Pol s'ancrent à la membrane plasmique au niveau des radeaux lipidiques. Ils s'associent ensuite sous forme de multimères. Les différents composants viraux s'assemblent, et les glycoprotéines d'enveloppe qui sont synthétisées au niveau du réticulum endoplasmique sont dirigées vers le lieu d'assemblage du virus et sont incorporées. L'interaction de Gag avec les protéines du complexe ESCRT initie le bourgeonnement. La particule virale bourgeonne et subit une maturation par la protéase virale (Bauby *et al.*, 2008).

**La multimérisation de Gag.** L'assemblage de la particule virale de VIH-1 résulte d'une multimérisation des monomères Gag qui interagissent entre eux pour former une capsid immature ayant l'aspect d'une cage fermée et qui donne à la particule sa forme spécifique. De 2000-5000 monomères de Gag sont nécessaires pour la formation d'une capsid immature de 100 nm de diamètre (Klein, Reed et Lingappa, 2007). L'assemblage progresse à travers des structures de plus en plus complexes appelées intermédiaires d'assemblage. Le processus est accéléré par la présence de l'ARN viral et dépend d'un apport énergétique sous forme d'hydrolyse d'ATP (Lingappa *et al.*, 1997 ; Morikawa *et al.*, 2000 ; Tritel et Resh, 2000). La multimérisation de Gag implique des interactions Gag-Gag, Gag-lipides et Gag-ARN (Freed, 2001). Plusieurs domaines de Gag sont impliqués dans les interactions Gag-Gag. Certains domaines (C-terminal de CA, le peptide SP1 et la région NC) sont particulièrement importants dans les interactions Gag-Gag alors que d'autres (domaine N-terminal de CA) n'interviennent que secondairement (Freed, 2001). Le domaine NC permet la concentration locale des molécules Gag et leur alignement dans une orientation favorable aux interactions Gag-Gag grâce à son interaction avec l'ARN viral (Cimarelli *et al.*, 2000 ; Freed, 2001 ; Ma et Vogt, 2002 ; Sandefur *et al.*, 2000). La région NC renferme aussi un domaine appelé I (pour interaction) qui agit indépendamment des deux doigts de zinc mais fait intervenir les résidus basiques qui les flanquent (Adamson et Jones, 2004).

**L'encapsidation de l'ARN viral.** L'ARN non épissé de VIH-1 sert à la fois comme ARN génomique qui sera emballé dans la particule virale et comme matrice pour la traduction des protéines Gag et Gag-Pol. Quand la concentration de Gag est faible, l'ARN est utilisé comme matrice pour la traduction de Gag dont l'accumulation va inhiber la traduction pour permettre l'utilisation de l'ARN comme ARN génomique (Klein, Reed et Lingappa, 2007). L'ARN viral renferme une séquence agissant *in cis* qui dirige son encapsidation. C'est l'élément d'encapsidation ou le site  $\psi$  situé dans la région 5' du codon d'initiation de gag (Berkowitz, Fisher et Goff, 1996). L'ARN

viral est empaqueté sous forme de dimère où les deux monomères sont liés par une séquence appelée le signal d'initiation du dimère, DIS (pour *dimer initiation signal*), situé à proximité de l'extrémité 5' de l'ARN. L'encapsidation de l'ARN viral implique des interactions entre l'élément d'encapsidation et le domaine NC de Gag. Ces interactions mettent en jeu les deux motifs en doigts de zinc et les résidus basiques qui les flanquent dans le domaine NC (Freed, 2001 ; Ganser-Pornillos, Yeager et Sundquist, 2008).

**L'incorporation des protéines de l'enveloppe virale.** Les protéines de l'enveloppe virale sont synthétisées sous forme d'un précurseur gp160 au niveau du réticulum endoplasmique rugueux où il est glycosylé et oligomérisé. La glycosylation de la gp160 est suivie durant son transport à travers l'appareil de Golgi où elle est clivée par une protéase cellulaire (furin ou furin-like) en glycoprotéines matures : gp120 et gp41, qui restent associées de façon non covalente. Les complexes de l'enveloppe atteignent la surface cellulaire *via* la voie sécrétoire et ils sont rapidement internalisés grâce à l'interaction du domaine C-terminal de gp41 avec les complexes AP-1 et AP-2 (*clathrin adaptor*) (Berlitz-Torrent *et al.*, 1999 ; Boge *et al.*, 1998 ; Ohno *et al.*, 1997). Le recrutement du complexe de l'enveloppe dans la particule virale semble impliquer une interaction entre la queue cytosolique de gp41 et le domaine MA de Gag. Ceci a été suggéré par le fait que des mutations dans le domaine MA ou dans la portion cytosolique de gp41 perturbent l'incorporation de l'enveloppe dans les virions (Dorfman *et al.*, 1994 ; Freed, 1998 ; Freed et Martin, 1995 ; Yu *et al.*, 1992). De plus, les effets des mutations de MA sur l'incorporation de l'enveloppe peuvent être inversés en tronquant la portion cytosolique de la gp41 (Murakami et Freed, 2000). En effet, la portion cytosolique de gp41 est si longue (150 résidus) que l'enveloppe ne peut être incorporée, ce qui nécessite le domaine MA pour un accommodement stérique. Des facteurs cellulaires seraient également impliqués tels que la protéine TIP47 (tail-interacting protein of 47 KDa) (Murakami, 2008).

### 1.3.2.5 Le bourgeonnement et la libération des particules virales

Le bourgeonnement des virions à partir de la membrane plasmique engage à la fois des domaines viraux et des facteurs cellulaires. Le domaine responsable du bourgeonnement est appelé domaine L (pour *late*) vu son rôle dans la phase finale de la production de la particule virale (Freed, 2001). Il est situé dans p6 et renferme un motif très conservé, PTAP, situé à proximité de l'extrémité N-terminale. La délétion de p6 ou des mutations dans le motif conservé empêche la libération des particules virales qui restent attachées à la membrane plasmique par une fine tige (Gottlinger *et al.*, 1991 ; Huang *et al.*, 1995). Des domaines L similaires à celui du VIH-1 ont été identifiés dans d'autres rétrovirus (SIV, VIH-2, M-PMV, HTLV-1) et sont fonctionnellement interchangeables (Bouamr *et al.*, 2003 ; Gottwein *et al.*, 2003 ; Myers et Allen, 2002 ; Wang, Machesky et Mansky, 2004). De plus, ils peuvent exercer leur fonction indépendamment de la position occupée dans Gag (Craven *et al.*, 1999 ; Martin-Serrano, Zang et Bieniasz, 2001 ; Parent *et al.*, 1995 ; Yuan *et al.*, 2000) ce qui a suggéré que le domaine L n'est pas un élément structural mais agit plutôt par recrutement de facteurs cellulaires vraisemblablement *via* le motif PTAP (Garrus *et al.*, 2001 ; VerPlank *et al.*, 2001). L'un des facteurs identifiés est le TSG101 dont l'inhibition de l'expression cause un arrêt du bourgeonnement en un stade tardif. Le TSG101 interagit, par son N-terminal, avec le motif PTAP. Le C-terminal de TSG101 interagit avec une protéine cellulaire, la VPS28 également essentielle au bourgeonnement (Adamson et Jones, 2004). La libération des particules virales implique une autre protéine cellulaire, la VPS4 à activité ATPasique. Ces protéines font partie des complexes multi-protéiques ESCRT (I, II et III) qui interviennent dans la voie qui dirige le tri des protéines destinées à la dégradation lysosomale (Freed, 2002 ; Garrus *et al.*, 2001 ; Katzmann, Babst et Emr, 2001). Il a été proposé que Gag recrute la machinerie ESCRT à travers son interaction avec TSG101 au niveau de la membrane plasmique où cette machinerie est utilisée pour la libération des particules virales (Adamson et Jones, 2004 ; Clague et Urbe, 2003). Le

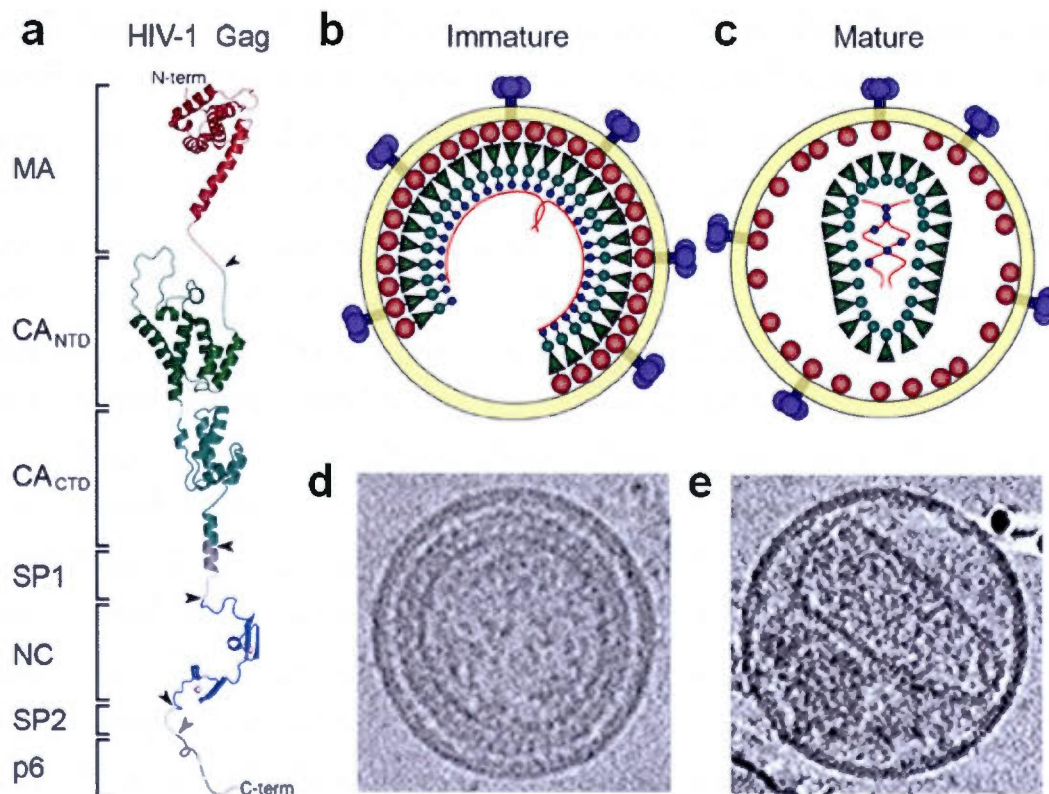


domaine p6 renferme, en plus du motif PTAP, un motif LYPX<sub>n</sub>L à son extrémité C-terminale et qui lie la protéine ALIX-AIP1. Cette dernière sert d'intermédiaire entre les complexes ESCRT-I et ESCRT-III. Cependant, le rôle de l'interaction ALIX-LYPX<sub>n</sub>L dans la libération des particules virales est secondaire (Popov *et al.*, 2008).

#### 1.3.2.6 La maturation des particules virales

La maturation est une étape essentielle à l'infectivité de la particule virale produite, elle débute avec le bourgeonnement de la particule et se poursuit après sa libération à l'extérieur de la cellule. La maturation est déclenchée par le clivage protéolytique de Gag catalysé par la protéase virale, PR, incorporée dans la particule sous forme de précurseur Gag-Pol et se traduit sur le plan morphologique par la formation d'une capside condensée d'une forme conique (Ganser-Pornillos, Yeager et Sundquist, 2008) (figure 1.13). Le clivage protéolytique se fait de manière séquentielle. Il débute à la jonction SP1-NC libérant les polypeptides NC-SP2-p6 et MA-CA-SP1. La protéolyse se poursuit dans le polypeptide NC-SP2-p6. La protéine NC associée à l'ARN viral se condense en nucléocapside au centre du virion. Le polypeptide MA-CA-SP1 reste lié à la face interne de l'enveloppe virale par le domaine MA (Fu et Rein, 1993 ; Wiegers *et al.*, 1998). Le clivage survenant à la jonction MA-CA libère la protéine MA qui subit un changement conformationnel provoquant la séquestration du groupement myristate. La protéine MA reste cependant associée à l'enveloppe virale (Bouamr *et al.*, 2003 ; Hermida-Matsumoto et Resh, 1999 ; Wiegers *et al.*, 1998 ; Zhou et Resh, 1996). Parallèlement, un changement conformationnel de la protéine CA se produit amenant l'extrémité N-terminale à se replier vers l'intérieur de la molécule, ce qui mène à la condensation de la capside. La maturation est complétée par la libération du C-terminal de CA par le clivage entre CA et SP1 (Adamson et Freed, 2008 ; Gamble *et al.*, 1996 ; Gitti *et al.*, 1996 ; Wiegers *et al.*, 1998).





**Figure 1.13. La maturation des particules virales**

(a) La maturation de la particule du VIH-1 est effectuée par le clivage protéolytique de Gag par la protéase virale PR et la libération des différents domaines. Les changements de conformation des domaines conduisent à la maturation de la particule virale. Les domaines individuels de Gag sont représentés en des couleurs différentes. Les régions désordonnées sont représentées en pointillés. Les flèches indiquent les sites de clivage. (b) et (c) Schémas de la particule virale immature et mature. (d) et (e) Images en microscopie électronique des particules virales immature et mature. Adapté de: (Ganser-Pornillos *et al.*, 2008)

## 1.4 L'intégrase et l'intégration

### 1.4.1 Structure de l'intégrase

L'intégrase du VIH-1 est synthétisée à partir d'un précurseur polypeptidique viral de 160 KDa, Pr160<sup>GagPol</sup> (Freed, 2001 ; Hindmarsh et Leis, 1999b). La protéine Pr160<sup>GagPol</sup> est empaquetée dans le virion et sera clivée par la protéase virale en protéines individuelles : protéase, transcriptase inverse et intégrase au cours de la maturation du virion. L'intégrase, une protéine de 288 acides aminés (32 KDa), est divisée en trois domaines fonctionnels distincts liés par des régions flexibles. Jusqu'à présent, il n'a pas été possible de résoudre la structure tridimensionnelle de l'intégrase pleine-longueur à cause de l'insolubilité de celle-ci dans les conditions de réaction. Cependant, la structure du domaine N-terminal lié au domaine catalytique et celle du domaine catalytique lié au domaine C-terminal ont été déterminées (Jaskolski *et al.*, 2009 ; Vandegraaff et Engelman, 2007) (Figure 1.14).

#### 1.4.1.1 Le domaine N-terminal (résidus 1-49)

Le domaine N-terminal est organisé en quatre hélices, les hélices  $\alpha 2$  et  $\alpha 3$  formant une structure hélice-tour-hélice (Cai *et al.*, 1997). Le domaine renferme un motif en doigts de zinc de type HHCC dont la substitution de l'un des résidus affecte l'activité catalytique de l'intégrase (Hindmarsh, 1999). Le domaine N-terminal intervient dans la multimérisation de l'intégrase, processus clé pour l'activité d'intégration, à travers des interactions protéine-protéine. Il intervient également dans la liaison à l'ADN (Engelman et Craigie, 1992 ; Engelman *et al.*, 1995).

#### 1.4.1.2 Le domaine central (résidus 50-212)

C'est le domaine catalytique de l'enzyme. Les études cristallographiques ont révélé que sa structure tridimensionnelle est similaire à celle des domaines catalytiques de certaines nucléases: RNase H et protéine RuVc d'*E. coli*, RNase H

de la RT de VIH-1 (Hindmarsh, 1999) et les transposases MuA, Tn5 et Mos1 (Cherepanov, Maertens et Hare, 2011). Ceci a conduit à classer l'intégrase dans la superfamille des poly-nucléotidyl-transférases (E.C.2.7.7.49) (Cherepanov, Maertens et Hare, 2011).

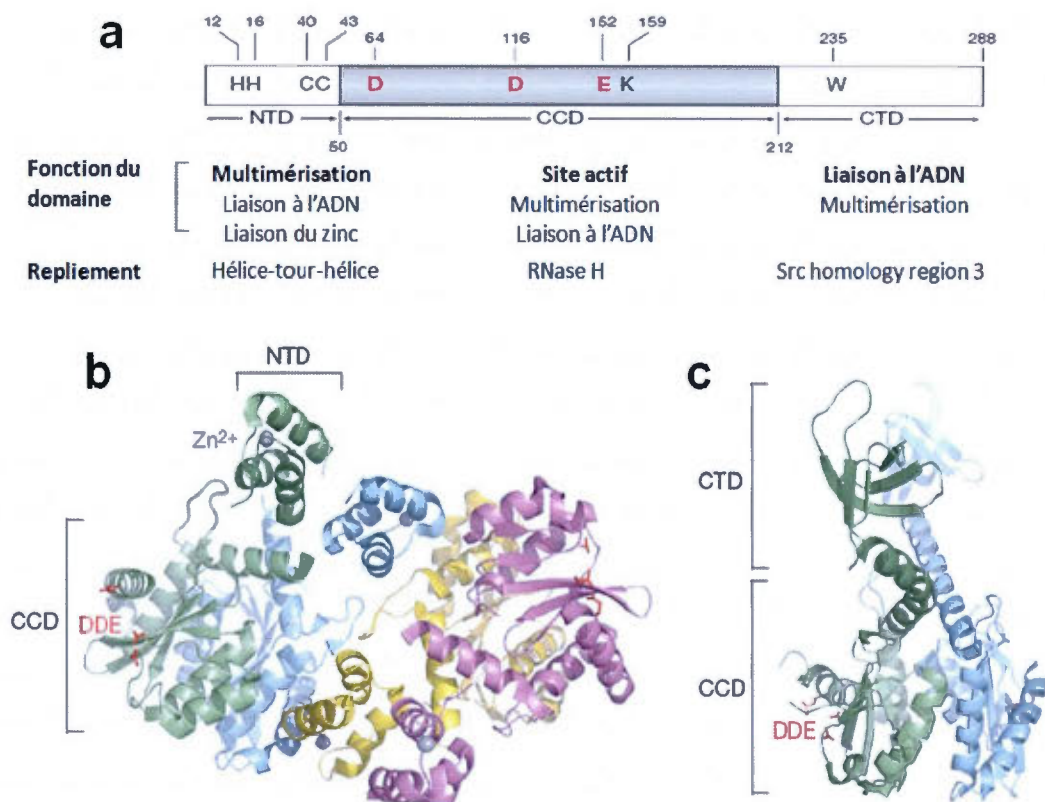
Le domaine central de l'intégrase de VIH-1 renferme trois résidus hautement conservés parmi toutes les intégrases rétrovirales, les DNA transposases et les rétrotransposases (Meadows et Gervay-Hague, 2006). Il s'agit des résidus D116, D164 et E152 organisés en un motif D, D(35)E (Hindmarsh, 1999; Meadows et Gervay-Hague, 2006). Chacun des trois acides aminés du motif est strictement requis pour l'activité catalytique de l'intégrase (à une exception où la substitution D116N a donné une intégrase plus active *in vivo*) (Engelman *et al.*, 1995).

Les résidus importants pour l'interaction spécifique avec l'ADN viral (Q148, Y143, K156, K159) sont également localisés dans le domaine catalytique et la mutation des lysines 156 et 159 abolit l'activité catalytique (Harper, Sudol et Katzman, 2003). Le domaine central est capable de lier par coordinence des cations bivalents,  $Mg^{2+}$  ou  $Mn^{2+}$ , au niveau des résidus D64 et D116 et reconnaît un dinucléotide conservé (CA) sur les LTR de l'ADN viral (Goldgur *et al.*, 1998 ; Heuer et Brown, 1997 ; Meadows et Gervay-Hague, 2006).

#### **1.4.1.3 Le domaine C-terminal (résidus 213-288)**

C'est le domaine le moins conservé des trois domaines de l'intégrase et est caractérisé par un repliement SH3-like qui caractérise de nombreuses protéines impliquées dans la transduction du signal mais aussi les protéines qui se lient à l'ADN (Chiu et Davies, 2004). Ce domaine est capable de lier l'ADN viral de manière spécifique et non spécifique et il a été proposé qu'il intervienne dans la stabilisation des interactions intégrase-ADN (Christ *et al.*, 2008 ; Turlure *et al.*, 2004). Par ailleurs, le domaine C-terminal intervient dans la multimérisation de

l'enzyme et contient des signaux de localisation nucléaire (NLS) que l'on retrouve dans plusieurs intégrases de rétrovirus et de transposons (Kukolj, Katz et Skalka, 1998).



**Figure 1.14. Structure et domaines de l'intégrase de VIH-1.**

(a) L'organisation en domaines de l'intégrase du VIH-1. L'intégrase comprend un domaine N-terminal (NTD), un domaine catalytique central (CCD) et un domaine C-terminal (CTD). Les résidus aspartate D64 et D116 glutamate E 152 forment le motif DDE qui constitue le centre catalytique de l'enzyme. (b) Structure cristallographique des résidus 1-212 de l'intégrase. Deux dimères NTD-CCD (vert/bleu et jaune/magenta) sont montrés. (c) Structure cristallographique d'un dimère des résidus 52-288 (CCD-CTD) de l'intégrase. Le monomère bleu facilite le positionnement de l'ADN (extrémités du LTR) au niveau des résidus DDE du monomère vert pour la catalyse. Adapté de: (Vandegraaff et Engelman, 2007).



## 1.4.2 L'intégration

### 1.4.2.1 L'oligomère actif

L'intégrase fonctionne sous forme multimérique comme le démontrent les expériences de complémentation dans lesquelles le mélange de protéines inactivées par des mutations dans des régions distinctes restaure l'activité (Lewinski et Bushman, 2005). Par ailleurs, la résolution de la structure de l'intégrase du PFV (*prototype foamy virus*), dont la séquence en acides aminés au niveau du site actif est très similaire à celle de l'intégase du VIH-1, a permis de proposer un modèle structural et fonctionnel où la forme active pour l'intégration concertée est un tétramère (Hare *et al.*, 2010a ; Hare *et al.*, 2010b ; Maertens, Hare et Cherepanov, 2010) (Figure 1.15). Ce dernier est constitué de deux dimères d'unités d'intégrase fonctionnellement distincts formés à chaque extrémité de l'ADN viral. L'un des deux dimères serait responsable des interactions protéine-ADN et de la catalyse alors que l'autre dimère semble avoir un rôle de soutien (Cherepanov, Maertens et Hare, 2011 ; Faure *et al.*, 2005 ; Gao, Butler et Bushman, 2001 ; Hartley *et al.*, 2004).

### 1.4.2.2 Le mécanisme d'intégration.

La réaction d'intégration se déroule en deux étapes : le clivage en 3' (*3'end processing*) et le transfert de brin d'ADN (*DNA strand transfer*) comme le montre la figure 1.16. Le clivage en 3' et le transfert de brin sont deux réactions endonucléasiques catalysées par l'intégrase alors que la réparation des discontinuités générées dans l'ADN cellulaire par la réaction d'intégration est assurée par des enzymes cellulaires (Daniel, Katz et Skalka, 1999 ; Yoder et Bushman, 2000).

Le clivage en 3' commence immédiatement après la transcription inverse de l'ARN viral en ADN linéaire double brin dans la cellule infectée. L'intégrase reconnaît de courtes séquences (20 pb) appelées sites d'attachement (att) aux extrémités U3 (5') et U5 (3') des LTR de l'ADN viral. Elle détache ensuite deux

nucléotides du côté 3' d'un dinucléotide (CA) hautement conservé créant ainsi deux extrémités 3'OH dans l'ADN viral (Engelman, Mizuuchi et Craigie, 1991 ; Katzman et Katz, 1999).

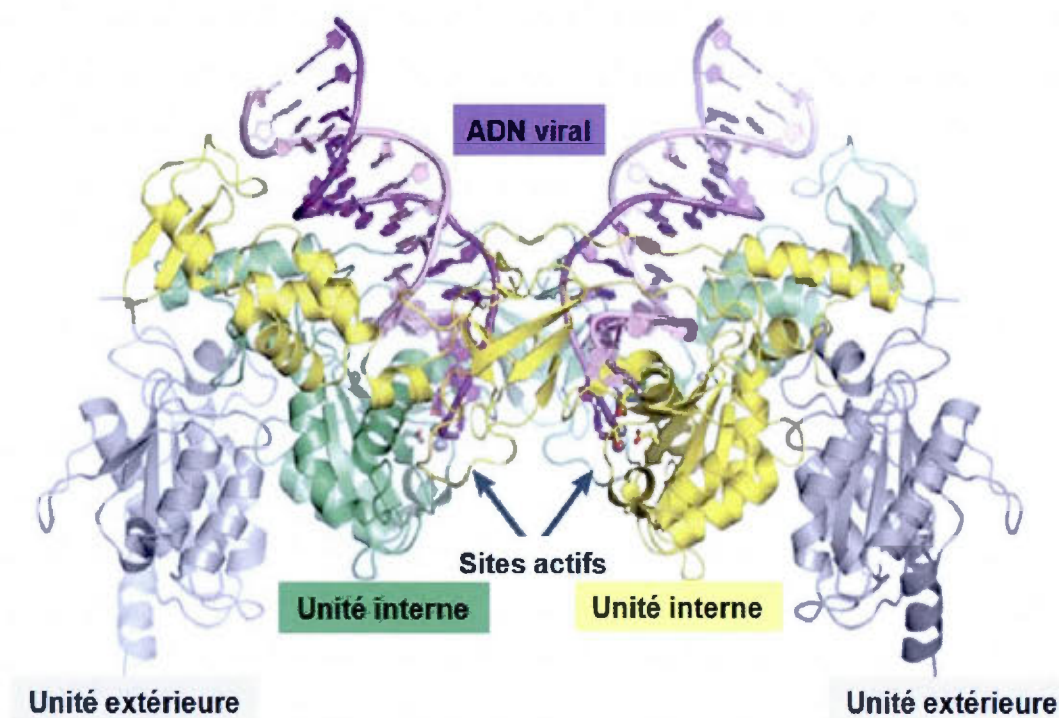
Au cours de la réaction de transfert de brin, l'intégrase utilise les extrémités 3'OH générées par le clivage en 3' dans une attaque nucléophile sur l'ADN cellulaire. Les 3'OH de l'ADN viral sont ensuite reliés aux 5'P de l'ADN cellulaire par une réaction de transestérification catalysée par l'intégrase (Engelman, Mizuuchi et Craigie, 1991). Le transfert de brin a lieu de façon séquentielle pour les deux extrémités de l'ADN viral avec un décalage de 5 paires de bases entre les deux points d'insertion opposés (Li *et al.*, 2006).

*In vivo*, le clivage en 3' a lieu dans le cytoplasme tandis que le transfert de brin est nucléaire. Le produit des deux réactions catalysées par l'intégrase est un intermédiaire de recombinaison (ADN viral-ADN cellulaire) avec deux nucléotides non appariés et des discontinuités à chaque extrémité de l'ADN proviral (Brown *et al.*, 1989 ; Fujiwara et Mizuuchi, 1988 ; Lee et Coffin, 1991). Finalement, la réparation de l'ADN après l'intégration donne naissance à une molécule d'ADN viral, le provirus, intégrée de manière co-linaire dans l'ADN cellulaire avec une duplication de 5pb de l'ADN cellulaire de part et d'autre du provirus (Vincent *et al.*, 1990 ; Vink, van Gent et Plasterk, 1990). Trois activités enzymatiques seraient nécessaires à la réparation de l'ADN après l'intégration: une activité ADN polymérase pour compléter les discontinuités sous forme de simple brin, une activité *flap* endonucléase pour éliminer les deux nucléotides non appariés à l'extrémité 5' de l'ADN proviral et une activité ligase pour terminer la réparation (Engelman, 2003).

Une activité de désintégration catalysée par l'intégrase *in vitro* a été suggérée (Chow *et al.*, 1992). Elle peut être considérée comme la réaction inverse du transfert de brin. Cependant, il n'existe pas de données expérimentales qui indiquent qu'une

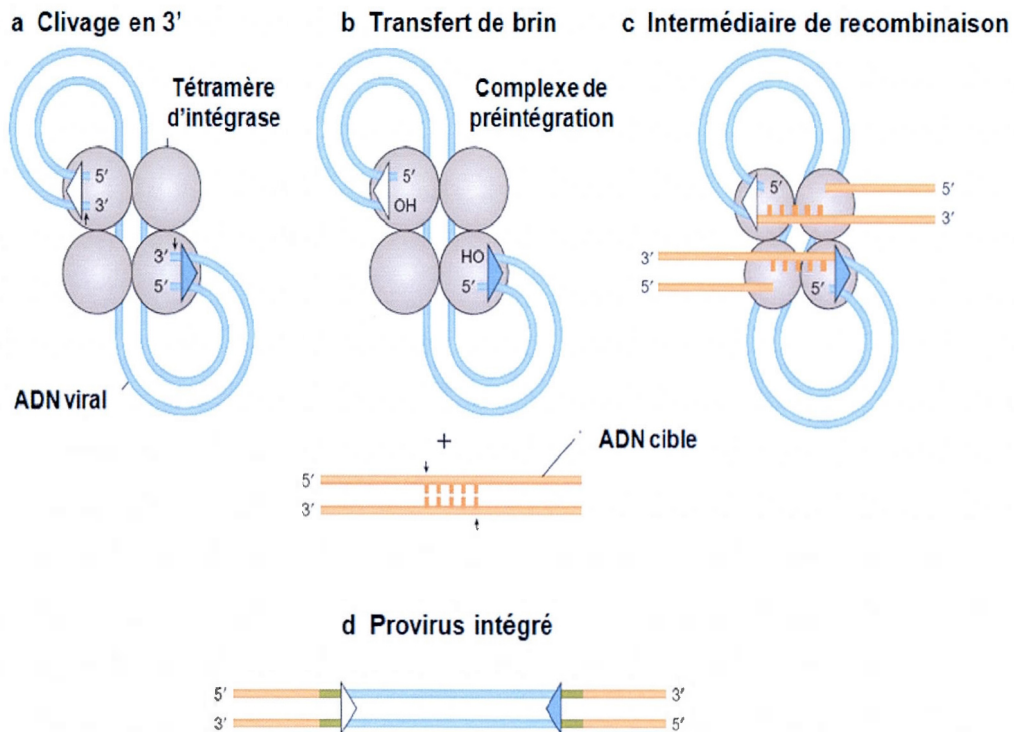


telle réaction puisse se produire *in vivo* (Mouscadet et al., 2007 ; (Cherepanov, Maertens et Hare, 2011 ; Delelis *et al.*, 2008).



**Figure 1.15. Structure de l'oligomère actif des rétrovirus.**

Structure de l'oligomère actif du PFV (prototype foamy virus) lié à l'ADN viral. L'intégrase virale forme un dimère de dimères où les deux sous-unités internes sont catalytiquement actives contrairement aux sous-unités extérieures. Adapté de: (Engelman et Cherepanov, 2012).



**Figure 1.16. Le mécanisme d'intégration de l'ADN de VIH-1.**

(a) Durant la réaction de clivage en 3', un tétramère de l'intégrase (cercles) se lie aux deux extrémités de l'ADN du VIH-1 formant un complexe nucléoprotéique. L'intégrase détache ensuite deux nucléotides de chaque extrémité 3'. (b) dans la réaction de transfert de brin, l'intégrase utilise les extrémités 3'OH de l'ADN viral clivé pour couper l'ADN cellulaire. (c) L'intégrase relie ensuite les 5'P de l'ADN cellulaire aux extrémités 3'OH de l'ADN viral. (d) La réparation de l'intermédiaire de recombinaison donne lieu à un provirus intégré et flanqué par une duplication de 5 pb de l'ADN cellulaire. Adapté de: (Vandegraaff et Engelman, 2007).

Dans les cellules infectées, une proportion de l'ADN viral qui peut représenter jusqu'à 99% de l'ADN viral total échappe à l'intégration et emprunte une voie non productive ce qui dénote que l'intégration est un évènement rare (Chun *et al.*, 1997). L'ADN viral non intégré est principalement sous forme linéaire mais des formes circulaires avec une ou deux copies du LTR (1-LTR et 2-LTR respectivement) ont également été détectées dans les noyaux de cellules infectées par le VIH-1 (Brown *et al.*, 1987 ; Vink *et al.*, 1990). Ces formes circulaires sont produites par l'action d'enzymes cellulaires impliquées dans la recombinaison non homologue (Kilzer *et al.*, 2003 ; Li *et al.*, 2001). Bien qu'aucun rôle dans la réplication virale n'a été attribué aux formes circulaires de l'ADN viral, une expression des protéines Tat et Nef à partir de ces formes a été rapportée (Wu et Marsh, 2001). L'intégrase peut également produire de l'ADN circulaire en catalysant l'autointégration de l'ADN viral *in vitro* (Shoemaker *et al.*, 1981).

#### **1.4.2.3 Les sites d'intégration.**

L'ADN de VIH-1 ne s'intègre pas de manière aléatoire dans le génome hôte, bien qu'il n'y ait pas de stricte spécificité de séquence pour l'intégration. En effet, il a été montré qu'il existe une préférence pour les séquences d'ADN possédant une symétrie de type palindromique et il semble que cette préférence dépend de l'intégrase elle-même (Grandgenett, 2005 ; Holman et Coffin, 2005 ; Wu *et al.*, 2005). Par ailleurs, l'analyse des sites d'intégration *in vivo* a révélé que les provirus se retrouvaient majoritairement dans les unités de transcription active probablement pour favoriser une expression efficace du génome viral (Ciuffi et Bushman, 2006). Cependant, il faut noter que l'intégration dans des régions activement transcrites n'assure pas nécessairement l'expression du provirus comme c'est le cas des provirus latents (Han *et al.*, 2004 ; Lewinski *et al.*, 2005).

Par ailleurs, le VIH-1, à l'instar des autres rétrovirus, doit interagir avec des facteurs cellulaires pour assurer une intégration qui ne soit pas désavantageuse pour la cellule hôte (Ciuffi et Bushman, 2006 ; Turlure *et al.*, 2004). En particulier, la protéine cellulaire LEDGF/p75 cible l'intégration de VIH-1 dans les gènes dont elle module la transcription grâce à son interaction avec l'intégrase (Ciuffi *et al.*, 2005 ; Shun *et al.*, 2007).

### 1.5 Les partenaires d'interaction de l'intégrase

L'intégrase purifiée est suffisante pour catalyser les deux réactions d'intégration *in vitro*, à savoir le clivage en 3' et le transfert de brin, mais la majorité des produits observés résulte de l'intégration d'un seul brin de l'ADN viral dans un brin de l'ADN cellulaire (Bushman et Craigie, 1991). Une réaction d'intégration concertée (c.-à-d. l'intégration des deux extrémités de l'ADN viral) est cependant possible *in vitro* en présence de complexes nucléoprotéiques de haut poids moléculaire, appelés complexes de préintégration (PIC), isolés des cellules infectées (Chen et Engelman, 2001 ; Farnet et Haseltine, 1990). Les PICs renferment, en plus de l'ADN viral linéaire et hautement condensé, des protéines virales : l'intégrase, la transcriptase inverse (RT), la protéine de la matrice (MA), la nucléocapside (NC), la protéine virale R (Vpr) et certainement d'autres protéines virales et cellulaires (Brown *et al.*, 1987, 1989 ; Ellison *et al.*, 1990 ; Fujiwara et Mizuuchi, 1988 ; Lee et Coffin, 1991).

L'importance des protéines cellulaires dans le processus d'intégration a été soulignée par de nombreuses observations. (i) Les PICs isolés de cellules infectées sont capables de catalyser une réaction d'intégration concertée *in vitro* contrairement à l'intégrase purifiée. (ii) Les PICs isolés de cellules infectées par le VIH-1 et traitées avec une forte concentration de sels puis purifiés perdent leur activité d'intégration (Chen et Engelman, 1998 ; Farnet et Bushman, 1997). (iii) L'addition d'extraits de cellules non infectées restaure l'activité catalytique des PICs prétraités aux sels

contrairement à l'addition de lysats de virions (Farnet et Bushman, 1997). Par ailleurs, les effets pléiotropiques des mutations de l'intégrase sur le virus (morphologie, formation et libération des particules virales, infectivité) suggèrent que l'intégrase interagit avec une panoplie de protéines cellulaires durant l'infection virale (Engelman, 1999).

Diverses méthodes ont permis d'identifier plusieurs protéines cellulaires capables d'interagir avec l'intégrase: (i) Reconstitution *in vitro* de l'activité d'intégration des PICs prétraités aux sels (Farnet et Bushman, 1997 ; Lee et Craigie, 1994). (ii) Criblage par la méthode du double hybride (Emiliani *et al.*, 2005 ; Kalpana *et al.*, 1994). (iii) Co-immunoprécipitation (Cherepanov *et al.*, 2003 ; Lin et Engelman, 2003 ; Turlure *et al.*, 2004). Cependant, le rôle de ces protéines dans l'intégration n'a pas été validé dans tous les cas.

Une liste des protéines ayant un rôle potentiel dans le processus d'intégration ou qui lient l'intégrase mais dont le rôle dans l'intégration n'a pas été rapporté est donnée dans le tableau 1.1. Il a été proposé que les protéines cellulaires interviennent dans l'intégration à trois niveaux : liaison de l'ADN viral, interaction directe avec l'intégrase et/ou réparation de l'ADN cellulaire après intégration (Turlure *et al.*, 2004). Certaines des protéines mentionnées dans le tableau 1.1. seront présentées brièvement à part la protéine LEDGF/p75 dont le rôle dans l'intégration a été largement étudié et qui sera abordée avec plus de détails.

**Tableau 1.1: Les partenaires d'interaction de l'intégrase du VIH-1.**

Protéine	Référence
ATR	(Daniel <i>et al.</i> , 2003)
ATM	(Daniel <i>et al.</i> , 2001)
ATP-dependent DNA helicase II (s-unité 80 kDa)	(Li <i>et al.</i> , 2001)
ATP-dependent DNA helicase II (s-unité 70kDa)	(Li <i>et al.</i> , 2001)
BAF	(Lee et Craigie, 1994)
EED	(Violot <i>et al.</i> , 2003)
Emerin	(Jacque et Stevenson, 2006)
Hsp60/10	(Parissi <i>et al.</i> , 2001)
LEDGF/p75	(Cherepanov <i>et al.</i> , 2003) (Maertens <i>et al.</i> , 2003)
hRAD18	(Mulder, Chakrabarti et Muesing, 2002)
PML	(Turelli <i>et al.</i> , 2001)
PRKDC	(Daniel, Katz et Skalka, 1999)
hSNF5 (INI1)	(Kalpana <i>et al.</i> , 1994)
MYST histone acetyltransferase 1, 2, 3, 4	(Cereseto <i>et al.</i> , 2005)
hepatoma-derived growth factor, related protein 3	(Vandegraaff <i>et al.</i> , 2006)
chaperonin containing TCP1, subunit 4 (delta)	(Parissi <i>et al.</i> , 2001)
uracil-DNA glycosylase isoform UNG2	(Willetts <i>et al.</i> , 1999)
cytosolic phosphoenolpyruvate carboxykinase 1	Parissi <i>et al.</i> , 2001
eukaryotic translation elongation factor 1 alpha 1	(Parissi <i>et al.</i> , 2001)
karyopherin alpha 1, alpha 2, alpha 3 karyopherin alpha 4, alpha 5, alpha 6	(Gallay <i>et al.</i> , 1997)



---

karyopherin beta 1, transportin 1  
Importin 5,

Importin7	(Ao <i>et al.</i> , 2007)
Importin alpha3	(Ao <i>et al.</i> , 2010)
Transportin-SR2	(Christ <i>et al.</i> , 2008)
SMN-interacting protein 1 isoform alpha (Gemin2)	(Hamamoto <i>et al.</i> , 2006)
Daax	(Huang <i>et al.</i> , 2008)
TTRAP	(Zhang <i>et al.</i> , 2009)
26S proteasome subunits	(Mulder et Muesing, 2000)
RAD51 homolog protein isoform 1	(Desfarges <i>et al.</i> , 2006)
poly (ADP-ribose) polymerase family, member 1	(Ha <i>et al.</i> , 2001)
high mobility group AT-hook 1 isoform b (HMGA1)	(Farnet et Bushman, 1997)
flap structure-specific endonuclease 1	(Faust et Triller, 2002)
KRAB-associated protein 1 (KAP1)	(Allouch <i>et al.</i> , 2011)
von Hippel-Lindau binding protein 1 (VBP1)	(Mousnier <i>et al.</i> , 2007)

---

### 1.5.1 BAF (*barrier to autointegration factor*)

La protéine BAF a été initialement identifiée comme un facteur cellulaire protégeant le virus MMLV (*Moloney murine leukemia virus*) de l'autointégration. L'intégration *in vitro* en présence de PICs isolés de MMLV et prétraités aux sels donnait majoritairement des produits d'autointégration (Lee et Craigie, 1994). Une intégration normale a été restaurée par l'addition de BAF purifiée (Lee et Craigie, 1998). Il a été alors proposé que BAF faisait partie intégrante des PICs et qu'elle a été détachée par le traitement aux sels. Par la suite, il a été montré que les PICs isolés de cellules infectées par le VIH-1 et traités aux sels étaient complètement inactifs *in*

*vitro* et que l'addition de BAF restaurait leur activité (Chen et Engelman, 1998). L'interaction de BAF avec l'intégrase a été ensuite montrée par co-immunoprécipitation (Lin et Engelman, 2003).

La protéine BAF aurait *in vivo* un rôle dans le maintien de l'architecture nucléaire et dans l'assemblage de la chromatine après la mitose. L'inhibition de son expression, par RNAi, dans les embryons de *Caenorhabditis elegans* résulte en un phénotype létal (Zheng *et al.*, 2000). BAF est capable de former des complexes nucléoprotéiques de haut poids moléculaire avec l'ADN double brin et il a été suggéré qu'elle agit sur l'ADN viral et le compacte, le protégeant ainsi de l'autointégration et facilitant son accès à la chromatine cellulaire. BAF serait même incorporée dans la particule virale grâce à son interaction avec le domaine matrice (MA) de la protéine Gag virale (Mansharamani *et al.*, 2003).

### 1.5.2 INI1 (*integrase interactor 1*)

La protéine INI1 (également appelée hSNF5, BAF47 ou SMARCB1) fut le premier facteur cellulaire identifié comme partenaire de l'intégrase de VIH-1 (Kalpana *et al.*, 1994). La protéine INI1 a été détectée par la méthode double hybride et son interaction avec l'intégrase a été confirmée par pull-down avec la glutathion S-transférase (GST). Le site d'interaction avec INI1 a été localisé dans le domaine N-terminal de l'intégrase.

La protéine INI1 est homologue à la protéine SNF5 de la levure. Elle fait partie d'un complexe ATP-dépendant du remodelage de la chromatine, le SWI/SNF qui intervient dans la régulation de la transcription et du cycle cellulaire (Kalpana *et al.*, 1994 ; Muchardt et Yaniv, 2001 ; Versteeg *et al.*, 1998).

Il a été rapporté que la protéine INI1 recombinante stimulait fortement la réaction de transfert de brin catalysée par l'intégrase *in vitro*, mais aucune évidence n'a été fournie pour soutenir son rôle dans l'intégration *in vivo* (Van Maele *et al.*,

2006). Par ailleurs, INI1 qui est une protéine nucléaire qui migre vers le cytoplasme juste après l'entrée du VIH-1 dans la cellule. La localisation de la protéine INI1 et celle des PICs a été suivie après l'infection et leur co-localisation parfaite a laissé suggérer que l'infection par VIH-1 induirait la migration de INI1 vers le cytoplasme et son association avec le PIC (Turelli *et al.*, 2001). Il a alors été proposé que l'interaction INI1-intégrase aurait pour effet de diriger sélectivement le PIC vers les régions de la chromatine enrichies en SWI/SNF (Bukrinsky, 2006 ; Greene et Peterlin, 2002 ; Van Maele *et al.*, 2006).

INI1 intervient à plusieurs étapes du cycle de réplication du VIH-1 mais les données concernant son rôle dans les étapes précoces sont contradictoires. Maroun et ses collaborateurs ont rapporté que l'inhibition de l'expression de INI1, par siRNA, stimulait la réplication virale qui se traduisait par une augmentation de la forme intégrée et des formes à 2 LTR du virus, suggérant que INI1 pourrait participer à une réponse antivirale (Maroun *et al.*, 2006). Par contre, dans une autre étude, il a été montré que les étapes précoces de la réplication du VIH-1, de l'entrée jusqu'à l'intégration, n'étaient pas affectées par la déplétion de INI1 (Ariumi *et al.*, 2006).

INI1 participe aussi aux étapes tardives. Ainsi, on a observé que les cellules MON, dérivées de tumeurs rhabdoïdes où INI1 n'est pas fonctionnel, produisaient moins de particules virales que les cellules 293T quand l'intégration est contournée par transfection d'un clone moléculaire du VIH-1 (Sorin *et al.*, 2006). De plus, l'infectivité des particules produites dans des cellules déficientes en INI1 était fortement réduite et pouvait être restaurée par la réexpression de INI1 dans les cellules productrices (Sorin *et al.*, 2006). Également, la surexpression d'un fragment de INI1 (fragment S6 comprenant les résidus 183-294 interagissant avec l'intégrase) inhibe fortement l'assemblage et la libération des particules virales. Il a été par ailleurs montré que l'effet inhibiteur de S6 n'était observé que si l'intégrase faisait partie du précurseur GagPol qui est synthétisé durant la phase tardive de la réplication

virale. L'expression stable de S6 dans des lymphocytes T leur conférait une résistance à l'infection par VIH-1 (Yung *et al.*, 2001).

INI1, au sein du complexe SWI/SNF, participe aussi à la transactivation de la transcription par la protéine Tat, et ce indépendamment de sa capacité à interagir avec l'intégrase (Ariumi *et al.*, 2006 ; Farnet et Haseltine, 1990 ; Mahmoudi *et al.*, 2006 ; Treand *et al.*, 2006).

### 1.5.3 EED (*Embryonic ectoderm development*)

C'est une protéine nucléaire appartenant à la superfamille des WD-repeat. Elle fait partie d'un complexe protéique impliqué dans la répression de la transcription par désacétylation des histones. L'interaction de la protéine EED avec l'intégrase a été montrée *in vitro* par pull-down avec la glutathion S-transférase et dans la levure par la méthode du double hybride (Violot *et al.*, 2003). L'interaction fait intervenir le domaine C-terminal de l'intégrase et deux régions distinctes en N-terminal de la protéine EED. De plus, la région C-terminale de EED semble stabiliser l'interaction.

La protéine EED stimule l'activité catalytique de l'intégrase recombinante *in vitro* (Violot *et al.*, 2003). Par ailleurs, l'intégrase et la protéine EED ont été co-localisées dans les noyaux à proximité des pores nucléaires dans les cellules infectées par VIH-1. La protéine EED interagit également avec la protéine de la matrice et une triple co-localisation de l'intégrase, de EED et de la protéine de la matrice a été observée dans le nucléoplasme (Violot *et al.*, 2003).

### 1.5.4 HSP60/HSP10

La protéine HSP60 est une protéine chaperon qui interagit avec l'intégrase et stimule faiblement son activité catalytique (Parissi *et al.*, 2001). Elle forme avec la co-chaperon HSP10 un complexe qui assurerait la stabilité de l'intégrase dans les cellules infectées (Turlure *et al.*, 2004). La protéine HSP60 interagit avec d'autres

protéines virales et son taux d'expression est augmenté suite à une infection virale au même titre que les autres chaperons, ce qui pourrait représenter simplement une réponse cellulaire générale à l'infection virale (Turlure *et al.*, 2004).

### 1.5.5 DNA-PKC (*DNA-dependent protein kinase complexe*)

Le complexe DNA-PKC est formée de deux sous-unités, l'une catalytique et l'autre non catalytique formée elle-même de deux protéine (KU70 et KU80). L'hétérodimère KU70/KU80 reconnaît et lie les extrémités libres de l'ADN double brin (Violot *et al.*, 2003).

Il a été proposé que le DNA-PKC intervient dans la réparation de l'ADN après l'intégration mais il n'est pas clair si le DNA-PKC joue un rôle actif dans la réparation ou si son rôle se limite à la protection de l'ADN contre la dégradation (Turlure *et al.*, 2004). Il a été observé qu'une infection rétrovirale induisait l'apoptose dans les lymphocytes *scid* qui sont déficients en DNA-PK (*DNA-protein kinase*), enzyme de réparation de l'ADN, et que cette réponse cellulaire à l'infection nécessitait une intégrase active (Daniel *et al.*, 2003). Par ailleurs, il a été rapporté que les cellules déficientes en DNA-PK et les autres enzymes de la voie NHEJ (*non homologous end joining*) sont faiblement transduites par les vecteurs rétroviraux (Daniel *et al.*, 2003). Ces données ont suggéré que les discontinuités présentes au niveau de l'intermédiaire d'intégration seraient perçues par la cellule hôte comme des dommages de l'ADN qui nécessiteraient l'intervention d'enzymes de réparation telles que la DNA-PK et vraisemblablement d'autres membres de la famille des PI-3 kinases (*phosphatidylinositol 3-kinase related protein kinases*) comme ATM (*ataxia telangiectasia mutated*) et ATR (*ATM and rad3-related*) (Daniel, Katz et Skalka, 1999).



### 1.5.6 ATM/ATR

Les protéines ATM et ATR sont chevauchantes quant aux substrats sur lesquels elles sont actives mais les deux enzymes ont des fonctions distinctes (Daniel *et al.*, 2003). ATM détecte de façon prédominante les cassures double brins de l'ADN et déclenche une réponse à tout moment du cycle cellulaire alors que ATR est activée par des agents tels que les rayons ultra-violet et par l'arrêt de la fourche de réplication durant la phase S (Shiloh, 2003).

Le rôle d'ATM dans le processus d'intégration est controversé. Certains travaux ont suggéré que ATM a une fonction compensatoire de celle de la DNA-PK dans les cellules déficientes en cette dernière mais qu'elle n'est pas nécessaire dans les cellules normales pour une infection rétrovirale (Daniel *et al.*, 2001). Cependant d'autres travaux ont montré que ATM était nécessaire à une infection efficace par VIH-1 (Lau *et al.*, 2005).

ATR semble nécessaire à l'accomplissement de l'intégration de l'ADN viral et/ou à la survie des cellules infectées. Des travaux ont montré qu'une grande proportion des cellules exprimant un dominant négatif de ATR, un ATRkd (*kinase dead*) entraînent en apoptose après une infection par un vecteur rétroviral ASV (*avian sarcoma virus*) et que cette réponse dépendait de l'activité de l'intégrase (Daniel *et al.*, 2003).

### 1.5.7 hRad18

La protéine Rad18 est impliquée dans la voie de réparation de l'ADN post-réplication. Son interaction avec l'intégrase du VIH-1 a été démontrée par des études de co-immunoprécipitation et de co-localisation (Mulder, Chakrabarti et Muesing, 2002). Rad18 est recrutée au niveau des régions d'ADN simple brin où elle interagit avec Rad6, une enzyme de conjugaison de l'ubiquitine, et le complexe ainsi formé possède des activités ATPase et ubiquitine ligase.



Dans le contexte d'une infection à VIH-1, hRad18 interagirait avec l'intégrase juste après la réaction de transfert de brin. Ensuite, l'hétérodimère Rad18-Rad6 pourrait déstabiliser les protéines du PIC qui restent liées à l'intermédiaire d'intégration pour permettre l'intervention des complexes de réparation de l'ADN (Mulder, Chakrabarti et Muesing, 2002). De manière intéressante, l'utilisation de cellules MEF (*Mouse embryonic fibroblasts*) RAD18<sup>-/-</sup> a révélé un rôle supresseur de Rad18 sur l'infection rétrovirale et l'absence de Rad18 se traduisait par une accumulation de l'ADNc viral et une augmentation de l'infection (Lloyd *et al.*, 2006).

### 1.5.8 VBP1 (Von Hippel Lindau *binding protein 1*)

La protéine VBP1 est une sous-unité de la protéine chaperon préfoldine qui se lie à des protéines comme l'actine et la tubuline et les transfère à la chaperonine CCT qui facilite leur repliement (Vainberg *et al.*, 1998). VBP1 interagit avec la protéine pVHL (Von Hippel Lindau *protein*) laquelle forme un complexe ubiquitine ligase (E3) en association avec les protéines Elongin B, Elongin C, Cullin 2 et Rbx1. Ce complexe permet la polyubiquitination de protéines cibles et leur dégradation par le protéasome 26S (Tsuchiya, Iseda et Hino, 1996).

VBP1 a été identifiée comme un partenaire cellulaire de l'intégrase du VIH-1 dans un criblage double hybride (Mousnier *et al.*, 2007). L'inhibition de l'expression de VBP1 entraînait une stabilisation de l'intégrase corrélée à son ubiquitination, indiquant que l'interaction de VBP1 avec pVHL d'une part et avec l'intégrase d'autre part conduit à la polyubiquitination de celle-ci et sa dégradation par le protéasome (Mousnier *et al.*, 2007). De plus, la diminution de l'expression de VBP1 inhibait la réplication du VIH-1 non pas à l'étape d'intégration mais au niveau de la transcription. Cet effet n'est observé que si l'étape d'intégration a eu lieu puisque l'inhibition de VBP1 n'affecte pas la transcription à partir d'un vecteur proviral transfecté (Mousnier *et al.*, 2007). Ainsi, le rôle de VBP1 serait d'assurer la transition entre l'intégration et la transcription du génome viral. En facilitant la dégradation de

l'intégrase, VBP1 permettrait le recrutement des enzymes de réparation de l'ADN au site d'intégration avant que la transcription n'ait lieu.

### 1.5.9 Gemin2

La protéine Gemin2 (ou *SMN-interacting protein 1*, SIP1) est une composante du complexe SMN (*survival motor neuron*) qui renferme, en plus des Gemin2 (2 à 8), les protéines SMN et Unrip (Warren *et al.*, 2009). Le rôle principal du complexe SMN dans la cellule est l'assemblage des petites ribonucléoprotéines nucléaires (snRNPs) (Kolb, Battle et Dreyfuss, 2007).

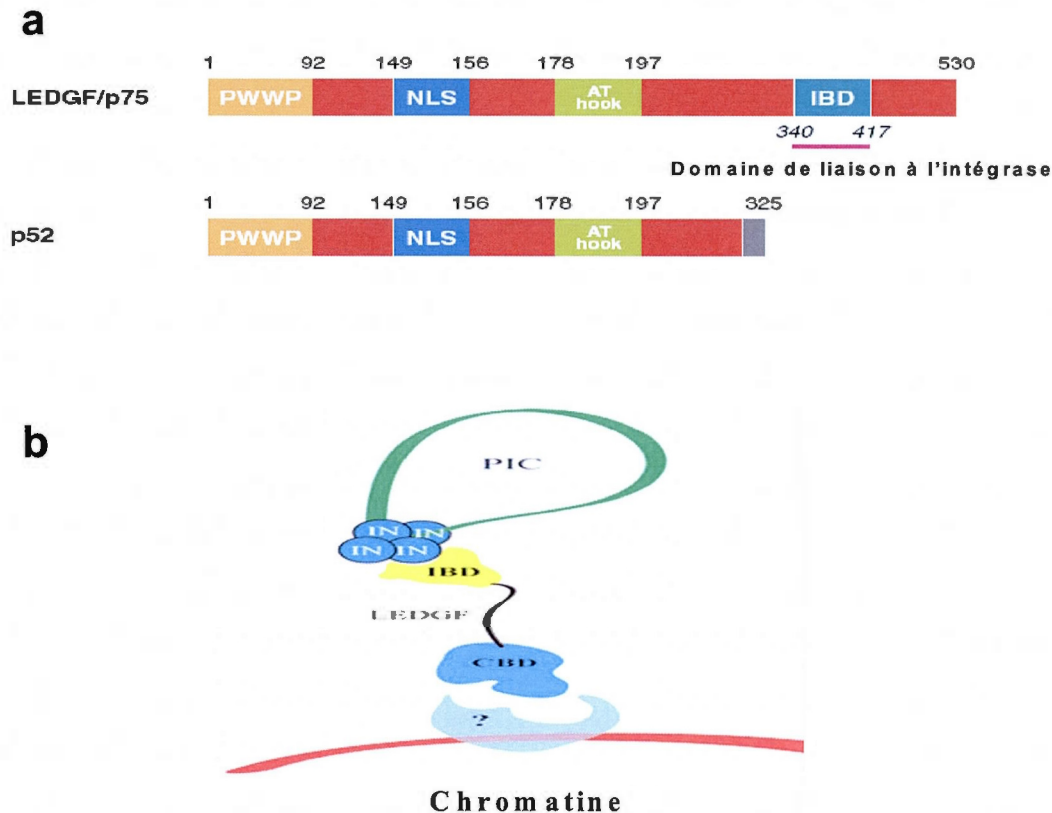
Gemin2 a été identifiée comme partenaire cellulaire d'interaction de l'intégrase du VIH-1. Son inhibition dans les macrophages dérivés de monocytes diminuait la réplication virale en raison d'une diminution de l'efficacité de la transcription inverse (Hamamoto *et al.*, 2006). De plus, les mutations de l'intégrase qui ont été associées à un phénotype défectueux en transcription inverse causent une diminution de l'interaction avec Gemin2 et enfin, Gemin2 augmente, *in vitro*, la réaction de transcription inverse d'une façon dépendante de l'intégrase (Nishitsuji *et al.*, 2009). Le rôle suggéré pour Gemin2 est d'assister l'assemblage de la transcriptase inverse et de l'intégrase sur l'ARN viral pour augmenter l'efficacité de la transcription inverse (Nishitsuji *et al.*, 2009).

### 1.5.10 LEDGF/p75 (*lens epithelium-derived growth factor*)

La protéine LEDGF/p75 a été identifiée comme partenaire cellulaire de l'intégrase de VIH-1 par Cherepanov et ses collaborateurs par filtration sur gel d'extraits nucléaires de cellules 293T exprimant l'intégrase à partir d'un gène synthétique (Cherepanov *et al.*, 2003). L'interaction de LEDGF/p75 avec l'intégrase a été par la suite confirmée par co-immunoprécipitation (Turlure *et al.*, 2004), par double hybride (Farnet et Bushman, 1997) et par pull-down (Maertens *et al.*, 2003). Le gène LEDGF code également pour une protéine plus petite, la p52, qui partage

avec la p75 une région de 325 résidus du côté N-terminal. Cependant, la protéine p52 n'interagit pas avec l'intégrase (Maertens *et al.*, 2003).

LEDGF/p75 renferme deux domaines: le domaine de liaison à la chromatine CBD (*Chromatine-Binding Domain*) et le domaine de liaison à l'intégrase ou IBD (*Integrase-Binding-Domain*). Le CBD renferme un motif PWWP (résidus 1-19), une séquence de localisation nucléaire et des motifs crochets AT reconnaissant les régions d'ADN riches en AT. Le CBD dirige la liaison de la protéine avec la chromatine. Le domaine IBD en C-terminal (347-429) est le domaine par lequel LEDGF/p75 interagit avec l'intégrase (Cherepanov *et al.*, 2004 ; Hare et Cherepanov, 2009 ; Vanegas *et al.*, 2005). L'interaction implique par ailleurs les régions centrale et N-terminale de l'intégrase (Figure 1.17).



**Figure 1.17. Caractéristiques structurales et fonctionnelles de LEDGF/p75.**

(a) Les deux isoformes LEDGF/p75 et p52 sont représentés. L'isoforme p75 renferme deux domaines un domaine de liaison à la chromatine (CBD) et un domaine de liaison à l'intégrase (IBD). Le CBD comprend un motif PWWP et un motif crochet AT (*AT hook*). (b) La protéine LEDGF/p75 cible le complexe de préintégration (PIC) sur la chromatine. Les extrémités de l'ADN viral (vert) sont associées à un tétramère d'intégrase (IN). La protéine LEDGF/p75 se lie à l'intégrase par son domaine IBD et cible le PIC sur la chromatine, grâce à son domaine CBD. Le partenaire d'interaction de LEDGF/p75 au niveau de la chromatine est inconnu. Adapté de: (a) (Cribier et Emiliani, 2007). (b) (Craigie, 2010).

La fonction cellulaire de LEDGF/p75 n'est pas bien établie (Hare et Cherepanov, 2009). Elle agirait comme facteur de croissance sur certains types cellulaires *in vitro* (Schroder et Riesner, 2002), comme co-activateur de la transcription (Ge, Si et Roeder, 1998) et comme facteur de survie impliqué dans la réponse cellulaire à une variété de stress abiotiques (Friedrich *et al.*, 2011 ; Turlure *et al.*, 2004 ; Van Maele *et al.*, 2006). LEDGF/p75 a également été identifiée comme un auto-antigène nucléaire dans certaines conditions inflammatoires (Ganapathy et Casiano, 2004).

Il a été montré que la LEDGF/p75 stimule considérablement la réaction de transfert de brin catalysée par l'intégrase recombinante *in vitro* (Cherepanov *et al.*, 2003) et que la réduction de LEDGF/p75 ou la surexpression du domaine IBD dans les cellules infectées bloque la réplication virale au niveau de l'intégration. Il a été proposé que le rôle de LEDGF/p75 serait de lier l'intégrase à la chromatine, une activité que l'on croyait au départ intrinsèque à l'intégrase (De Rijck *et al.*, 2006 ; Llano *et al.*, 2006). En effet, des études ont montré que la distribution nucléaire de l'intégrase correspond parfaitement à celle de LEDGF/p75 et que l'inhibition de l'expression de LEDGF/p75 (par siRNA) entraîne la diffusion de l'intégrase dans le noyau (Cherepanov *et al.*, 2003 ; Maertens *et al.*, 2003). Par ailleurs, une mutation de l'intégrase (Q168A) qui abolit son interaction avec LEDGF/p75 entraîne une nette réduction de la réplication virale bien que cette mutation n'affecte pas l'activité de l'intégrase *in vitro* (Emiliani *et al.*, 2005). Un rôle de LEDGF/p75 dans la protection de l'intégrase contre la dégradation *in vivo* a également été proposé car l'addition d'inhibiteurs du protéasome à des cellules déficientes en LEDGF/p75 permettait de restaurer l'accumulation de l'intégrase dans le noyau (Emiliani *et al.*, 2005 ; Llano *et al.*, 2004).

L'interaction avec LEDGF/p75 est exclusive aux intégrases des lentivirus qui ont la particularité de s'intégrer dans les unités à transcription active. Cette propriété

dépend de l'interaction de l'intégrase avec LEDGF/p75 car en l'absence de celle-ci, le VIH-1 présente les mêmes profils d'intégration que les rétrovirus non lentiviraux à savoir l'intégration dans les promoteurs ou les îlots riches en CpG (Hare et Cherepanov, 2009). Le modèle actuel pour la fonction de LEDGF/p75 dans le processus d'intégration stipule que LEDGF/p75, par l'intermédiaire de son domaine N-terminal, se lie à la chromatine au niveau des régions à transcription active et par son IBD amène le PIC à s'intégrer dans ces régions tout en stimulant l'activité de transfert de brin de l'intégrase (Ciuffi et Bushman, 2006 ; Friedrich *et al.*, 2011 ; Hare et Cherepanov, 2009 ; Van Maele *et al.*, 2006). L'inhibition de l'interaction entre LEDGF/p75 et l'intégrase par de petites molécules s'est avérée possible et les inhibiteurs développés ont montré une forte inhibition de la réplication virale en culture cellulaire (Christ *et al.*, 2012; Christ *et al.*, 2010).



## PROBLÉMATIQUE ET OBJECTIFS

Afin d'établir une infection productive, le VIH-1 a besoin de transcrire son génome constitué d'ARN en ADN double brin et d'intégrer ce dernier dans le génome de la cellule hôte. L'intégration, catalysée par l'intégrase virale, permet ainsi au virus de persister dans la cellule et aussi de se répliquer car celui-ci ne peut pas se répliquer sous sa forme non intégrée. L'intégrase interagit avec de nombreux facteurs cellulaires pour assurer une intégration efficace du virus mais aussi pour accomplir d'autres fonctions qui ne sont pas moins essentielles pour la réplication virale. L'identification des partenaires d'interaction de l'intégrase a fait l'objet de recherches intenses ces deux dernières décennies, dans la perspective de définir de nouvelles cibles thérapeutiques. Les partenaires de l'intégrase ont été identifiés par différents groupes en utilisant différentes approches expérimentales. Ceci reflète l'absence d'une méthode systématique et il est raisonnable de penser que beaucoup de ces partenaires restent à identifier.

Notre premier objectif était d'identifier de nouveaux partenaires cellulaires de l'intégrase. Pour ce faire, nous avons conçu une nouvelle approche basée sur une séparation biotine-streptavidine où un ADN reproduisant une portion du génome viral, le U3-LTR, et renfermant un site d'attachement de l'intégrase a été utilisé comme appât pour purifier l'intégrase et les protéines associées. Il s'agissait par la suite d'identifier ces protéines par spectrométrie de masse et de vérifier leur interaction avec l'intégrase.

Comme deuxième objectif, nous avons à étudier l'impact sur le processus d'intégration des protéines dont l'interaction avec l'intégrase avait été validée. Il était

aussi intéressant d'étudier l'impact de ces protéines sur les autres étapes de la réplication, étant donné que le rôle de l'intégrase ne se limite pas à l'intégration.

## **CHAPITRE II**

### **Identification of putative cellular HIV integrase interacting proteins**

**Fadila Larguet, Eric Rassart and Elsy Edouard**

**2012**

**À soumettre**

## Avant-propos

La réplication du VIH-1 requiert la transcription inverse de l'ARN viral en ADN linéaire lequel est par la suite intégré dans le génome cellulaire par l'intégrase virale. En plus de catalyser l'intégration, l'intégrase agit à différentes étapes du cycle viral à travers de multiples interactions protéine-protéine avec des facteurs cellulaires. Certains de ces facteurs ont été identifiés en appliquant des approches expérimentales différentes dont les criblages par la méthode du double hybride (Emiliani *et al.*, 2005; Kalpana *et al.*, 1994) et la co-immunoprécipitation (Cherepanov *et al.*, 2003 ; Lin et Engelman, 2003 ; Turlure *et al.*, 2004). Ainsi, notre hypothèse était qu'en utilisant une stratégie nouvelle, il est possible d'identifier de nouveaux partenaires cellulaires de l'intégrase.

L'objectif du présent chapitre était de purifier l'intégrase et les protéines qui lui sont associées. Pour ce faire, nous avons appliqué une méthode de séparation avec des billes magnétiques couplées à la streptavidine. Sachant que l'intégrase se lie à l'extrémité U3 du LTR viral pour catalyser l'intégration *in vivo*, nous avons choisi d'utiliser comme appât un ADN correspondant au U3 LTR. L'ADN a été biotinylé et incubé avec des extraits de cellules 293T qui expriment de manière stable l'intégrase. Ensuite, les protéines co-purifiées avec l'intégrase ont été analysées par spectrométrie de masse à des fins d'identification. La méthode que nous avons développée a permis d'identifier des protéines déjà connues dans la littérature comme cofacteurs de l'intégrase du VIH-1 ainsi que des protéines nouvelles telles que les RNA hélicases DDX5 et DDX17 qui représentent des partenaires potentiels de l'intégrase du VIH-1.

J'ai été impliquée dans toutes les facettes des travaux associés à cet article. Edouard E. et moi avons élaboré le design expérimental. J'ai par la suite effectué les travaux en laboratoire. J'ai optimisé les conditions de la purification et analysé les résultats de la spectrométrie de masse. J'ai aussi rédigé le manuscrit et conçu les figures. Edouard E. et Rassart E. ont corrigé le manuscrit.

## 2.1 Résumé

Le VIH-1 est capable de détourner la machinerie cellulaire pour sa propre réplication à travers des interactions protéiques virus-hôte. Ainsi, une stratégie nouvelle pour contrer l'infection à VIH-1 repose sur l'inhibition de ces interactions. L'intégration de l'ADN du VIH-1 dans le génome de la cellule hôte est une étape essentielle dans le cycle de réplication virale. L'intégrase virale est nécessaire et suffisante pour catalyser la réaction d'intégration *in vitro*. Cependant, l'activité de l'enzyme est modulée *in vivo* par des protéines virales et des protéines cellulaires. L'intégrase est également impliquée dans d'autres étapes du cycle de réplication qui pourraient faire intervenir des interactions avec des facteurs cellulaires dont plusieurs ont été identifiés par des approches expérimentales différentes. En utilisant une stratégie différente, nous avons cherché à identifier de nouveaux partenaires cellulaires de l'intégrase. Nous avons utilisé un ADN appât biotinylé correspondant à l'extrémité U3 du LTR viral afin de purifier l'intégrase et les protéines qui lui sont associées à partir d'une lignée cellulaire exprimant l'intégrase, et ce par une méthode de séparation avec des billes magnétiques couplées à la streptavidine. L'analyse par spectrométrie des protéines purifiées a permis d'identifier des protéines reconnues comme cofacteurs de l'intégrase du VIH-1 (XRCC5/Ku80, FEN-1, PARP1, INI1, EMD, HMGB-1, HMGB-2, HSP60, HDAC1 et LEDGF/p75) ainsi que d'autres protéines cellulaires telles que les RNA hélicases DDX5 et DDX17 qui représentent des partenaires potentiels de l'intégrase du VIH-1.

Mots-clés: VIH-1, intégrase, cofacteurs, RNA hélicases, DDX5, DDX17, HDAC1

## 2.2 Abstract

HIV-1 is able to hijack the cellular machinery for its own replication through interactions between viral and host cell proteins. Therefore, a novel strategy against HIV-1 infection is to target virus-cell interactions. HIV-1 DNA integration into the host cell genome is an essential step in the replication cycle of the virus. The viral integrase is necessary and sufficient to catalyze the integration reaction *in vitro*. However, the enzyme's activity is modulated *in vivo* by viral and cellular proteins. HIV-1 integrase is also involved in other steps of viral replication that may imply interactions with host factors. Several cellular proteins have been identified as integrase partners, using different experimental approaches. Based on a different strategy, our study aimed to identify new integrase cellular cofactors. We used a biotinylated DNA bait, corresponding to the U3-LTR end, to pull down the integrase and its associated proteins from a HIV integrase expressing cell line by streptavidin-coupled magnetic beads separation. Mass spectrometry analysis of purified proteins allowed us to identify known HIV integrase cofactors (XRCC5/Ku80, FEN-1, PARP1, INI1, EMD, HMGB-1, HMGB-2, HSP60, HDAC1 and LEDGF/p75) as well as other cellular proteins, including DDX5 and DDX17 RNA helicases, representing potential HIV integrase partners.

Keywords: HIV-1, integrase, cofactors, RNA helicases, DDX5, DDX17, HDAC1



### 2.3 Introduction

HIV-1 replication requires reverse transcription of the viral RNA genome in linear DNA and its integration into the host cell chromosome. Integrase (IN) is necessary and sufficient for the integration reaction *in vitro* (Bushman, Fujiwara et Craigie, 1990). In infected cells, however, integrase functions in the context of the preintegration complex (PIC), a large nucleoprotein structure that contains the linear viral cDNA, viral proteins and cellular factors that play important roles in the integration reaction. Besides integration, HIV-1 IN is involved in different steps of the virus life cycle: uncoating, reverse transcription, PIC nuclear import and viral maturation (Briones, Dobard et Chow, 2010 ; Jayappa *et al.*, 2011 ; Mohammed, Topper et Muesing, 2011 ; Vandegraaff et Engelman, 2007). Studies using either reconstituted PIC activity, yeast two-hybrid system, co-immunoprecipitation or pull down assay have identified host proteins interacting with IN. Many of these proteins were shown to affect integration and HIV-1 replication in cell-culture experiments.

## 2.4 Findings

In this study, we developed an *in vitro* system using streptavidin-coupled magnetic beads separation followed by mass spectrometry. A biotinylated DNA that reproduces a part of U3-LTR containing IN attachment site was used as bait to pull down the protein complex formed by HIV IN and host proteins from cells expressing IN only i.e. 293T-IN<sup>s</sup>ala cells (Cherepanov *et al.*, 2000). The experimental strategy is schematized in Figure 2.1. In order to co-purify the integrase with its interacting proteins, it was important to ensure a strong binding of HIV IN along the pull down assay. We tested different buffer conditions and used different DNA baits, double-stranded oligonucleotides or PCR fragments, from U3-LTR of HIV and MuLV genomes (data not shown). Curiously, the optimal purification conditions were achieved with a 316 bp DNA fragment derived from CasBrE MuLV U3-LTR [position 7736 to 8022, GI58830]. However, it was already known that HIV-1 IN binds HIV-1 LTR as well as MuLV LTR (Balakrishnan et Jonsson, 1997). Since the HIV IN binding to this DNA fragment was very strong in our conditions, experiments were pursued with this bait.

Purification was performed as follows: streptavidin magnetic beads (Dynabeads® M-280 Streptavidin, Invitrogen) (10 mg) were washed in 1M NaCl buffer (5 mM Tris-HCl pH 7.5, 0.5 mM EDTA, 1M NaCl) and then incubated with 2 µg of the biotinylated DNA bait for 30 min at room temperature with rotation. Following extensive washes in 1M NaCl buffer, beads were mixed with 0.5 mg of nuclear extracts or 1 mg of total extracts from 293T-IN<sup>s</sup>ala or 293T control cells in the binding buffer (20 mM HEPES pH 7.9, 50 mM KCl, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.05 mM EDTA, 5% glycerol and 1 mg/ml BSA). The mixture was incubated for 30 min at room temperature with rotation and following extensive washes with 0.1M NaCl buffer, proteins were eluted with a 0.5M NaCl buffer. Samples were resolved on SDS-PAGE and subjected to silver nitrate staining and anti-integrase immunoblot.

Although HIV integrase was present in both types of 293T-IN<sup>s</sup>ala cell extracts, IN binding was stronger with nuclear extracts than with total extracts (Fig. 2.2A-B). Further experiments were performed with nuclear extracts even though some interactions were likely lost. Bound complexes were eluted in two independent experiments using nuclear extracts from 293T-IN<sup>s</sup>ala cells and 293T cells incubated with the streptavidin beads complexed with the DNA bait, and then run on a 4-12 % SDS-PAGE followed by silver nitrate staining (Fig. 2.3A).

To identify proteins associated with IN, bands giving a different profile between 293T-IN<sup>s</sup>ala and 293T control purified fractions were excised and submitted to LC-MS/MS mass spectrometry (See Fig. 2.3A). The resulting dataset was blasted against the NCBI nr 20060921 database for viral sequences. As expected, HIV-1 IN was identified from a band near 32 KDa with 4 individual matching peptides covering 20% of the total protein sequence. Searching the dataset against the NCBI nr 20060525 database identified several human proteins. Table 2.1 listed the proteins identified with the highest scores for each band.

As a validation of our method, we found various known HIV IN cofactors or regulators such as ATP-dependent helicase II/Ku80 (XRCC5) (Li *et al.*, 2001), flap structure-specific endonuclease 1 (FEN1) (Faust et Triller, 2002), poly (ADP-ribose) polymerase 1 (PARP1) (Ha *et al.*, 2001) and HDAC1, very recently reported (Allouch *et al.*, 2011) (See Table 2.1). Moreover, other IN-interacting proteins including the lens epithelium-derived growth factor/transcription co-activator p75 (LEDGF/p75) (Cherepanov *et al.*, 2003), INI1 (SMARCB1) (Kalpana *et al.*, 1994), heat shock protein 60 (HSP60) (Parissi *et al.*, 2001) and emerlin (EMD) (Jacque et Stevenson, 2006) were identified by mass spectrometry although with lowest scores (data not shown). We also found three HMG-Box proteins, HMGB-1, HMGB-2 and HMGB-3 that are functionally related to the HMG AT-hook protein (HMGA1) already described as HIV-1 IN cofactor. HMGB-1 and HMGB-2 proteins were also

reported to stimulate HIV-1 integration *in vitro* although their contribution to the integration reaction *in vivo* could not be demonstrated (Hindmarsh *et al.*, 1999). We compared our data with the *in silico* HIV-host protein interactions study of Tastan *et al.* (Tastan *et al.*, 2009), which has predicted up to 90 percent of integrase interactions reported in the literature. Interestingly, we found that several proteins among those identified in our experiment (HDAC1, HSP70, DDX17, HIST1H2BN, XRCC5, PARP-1, INI1, EMD, LEDGF/p75, HSP60) were also predicted to interact with IN by this model (Tastan *et al.*, 2009).

Using available antibodies in the laboratory, we further validated the presence of HDAC1 as well as Fen-1 in the 293T-IN<sup>s</sup>ala purified fractions by western blot (Fig. 2.3B). These two proteins known to interact with HIV-IN, although present in the 293T input fraction, were not recovered by purification in the absence of HIV IN. More importantly, using specific antibodies, we found that DDX5 and DDX17 RNA helicases, two proteins identified with high scores by mass spectrometry (See Table 2.1), were present only in the 293T-IN<sup>s</sup>ala purified fractions (See Fig. 2.3B).

Overall, these results demonstrate the effectiveness of our approach and raise the interest for DDX5 and DDX17 in addition of the remaining identified proteins, as potential cellular cofactors of HIV IN. All identified proteins were already associated with various biological functions (See Table 2.1) such as ribosomal constitution, rRNA processing, mRNA processes (splicing, processing, transport, stabilization), transcription, stress response, translation, protein modification, DNA repair and recombination, chromatin architecture and cell cycle (Table 2.1). Given the diversity of IN-associated functions, it is not surprising that the integrase could interact with different host factors. The large number of IN cofactors identified to date highlights this concept. However, we are aware that some of the proteins identified, especially the DNA binding proteins, may be non-specifically purified with the integrase.

It is noteworthy that several RNA helicases (DDX5, DDX21, DDX17, DDX1, EIF4A3) were identified with high scores. HIV-1 does not code for any RNA helicase but there are evidences that the virus utilizes cellular RNA helicases to regulate several viral functions such as reverse transcription, mRNA transcription, nuclear export of viral RNA and particle assembly (Lever et Jeang, 2011). Furthermore, Studamire & Goff (Studamire et Goff, 2008) have already reported that DDX5 interacts with Moloney MuLV IN in a yeast-two hybrid screen. Moreover, DDX17, which is closely related to DDX5, has also been predicted to interact with HIV-1 IN in Tastan's study (Tastan *et al.*, 2009). Our results, which correlated with these data, strongly suggest the involvement RNA helicases, especially DDX5 and DDX17, in IN associated functions.

HDAC1 was recently described by Allouch *et al.* (Allouch *et al.*, 2011) to be recruited by KAP1 protein to induce integrase deacetylation. Our data are in accordance with HDAC1 and HIV IN interaction since we were able to co-purify this protein with HIV-IN using our method. More interestingly, HDAC1 is also known to be recruited by DDX5 and DDX17 RNA helicases for gene transcription repression (Wilson *et al.*, 2004). Thus, altogether it is tempting to speculate that HDAC1, DDX5 and DDX17 form a protein complex with HIV integrase.

Several proteins already known to interact with viral proteins other than IN were also co-purified including Lamin B1 and HSP70 that interact with Vpr (Agostini *et al.*, 2000 ; de Noronha *et al.*, 2001), DDX1 with Rev (Robertson-Anderson *et al.*, 2011) and Calmodulin with MA and Nef (Matsubara *et al.*, 2005 ; Radding *et al.*, 2000). IN may recruit these proteins for its own functions or to allow their interaction with other viral proteins during HIV infection. Finally, TERF2 and POLR2H (SeeTable2.1), in addition to HDAC1 and HMGB1, were already reported to be involved in HIV-1 infection by the high-throughput cell-line-based siRNA screens of König *et al.* (König *et al.*, 2008) and Zhou *et al.* (Zhou *et al.*, 2008a). The fact that we

co-purified these proteins with HIV IN may indicate that their involvement in HIV replication probably implies an interaction with the integrase.



## 2.5 Conclusion

We present in this issue an experimental approach to trap HIV IN and its interacting host factors using a biotinylated DNA fragment mimicking the integrase-binding site as bait. As a validation of our method, we simultaneously purified several integrase partners or regulators already reported in the literature. Indeed, our findings are supported by the overlap with published data and *in silico* studies. More importantly, we provide data that strongly suggest an interaction between HIV IN and DDX5 and DDX17 RNA Helicases. Finally, we generated a list of proteins with a great potential as interacting partners of HIV-1 integrase. A detailed characterization of these candidates should elucidate their IN-associated role in virus replication and assess their potential as new targets for antiretroviral therapies.

## 2.6 Acknowledgements

We thank Dr Debyzer Z., Prof. Stahl H. and Dr. Uhlmann-Schiffler H. for their generous gifts. We also thank Dr. Barbeau B. for his great help and Dr. Dag E. Helland for his precious antibodies through the NIH AIDS research and reagent program.

Table 2.1: HIV-1 integrase interacting proteins identified by mass spectrometry.

Identified protein	Gene name	Accession no	MW (KDa)	Total score	peptide no	Coverage (%)	Main biological function
<b>Band 1</b>							
RNA helicase II/Gu protein	DDX21	gi 11890755	80.210	658	21	27	rRNA processing
Transducin beta-like 3	TBL3	gi 16307379	90.347	605	16	25	signalling, rRNA processing
DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box polypeptide 1	DDX1	gi 31565475	83.349	462	12	20	Transcription, mRNA processing
ATP-dependent DNA helicase II (Ku80)	XRCC5	gi 10863945	83.222	461	11	18	DNA repair, Transcription
Transcription factor NF-AT 90K chain - human	ILF3	gi 1082856	73.977	302	9	17	Transcription
<b>Band 2</b>							
RNA helicase II/Gu protein	DDX21	gi 11890755	80.210	423	13	nd	rRNA processing
HnRNP R protein	HNRNPR	gi 12655185	71.456	413	9	nd	mRNA splicing, processing
Structure specific recognition protein 1	SSRP1	gi 4507241	81.367	298	5	10	DNA repair, Transcription
Metastasis-associated protein	MTA1	gi 2498589	81.422	163	4	nd	signal transduction
<b>Band 3</b>							
DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box polypeptide 5	DDX5	gi 4758138	69.618	999	43	36	mRNA processing
Heat shock protein (HSP70-1/2)	HSPA1A	gi 386785	70.110	571	12	20	Stress response
Fused in sarcoma	FUS	gi 48145611	53.622	525	22	23	nuclear mRNA splicing
DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box polypeptide 17	DDX17	gi 47678395	73.138	464	18	16	RNA processing
HNp56	NOP56	gi 2230878	67.206	451	10	23	rRNA processing
<b>Band 4</b>							
DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box polypeptide 5	DDX5	gi 4758138	69.618	758	21	nd	mRNA processing
Paraspeckle component 1	PSPC1	gi 57209129	58.820	719	25	28	Transcription regulation
HnRNP R protein	HNRNPR	gi 12655185	71.456	423	19	16	mRNA splicing, processing
HnRNP L	HNRNPL	gi 11527777	64.617	404	10	23	nuclear mRNA splicing
DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box polypeptide 17	DDX17	gi 47678395	73.138	310	9	nd	RNA processing
<b>Band 5</b>							
Unnamed protein product (homologue to hnRNP L)	HNRNPL	gi 32356	60.719	812	32	45	nuclear mRNA splicing
Poly(ADP-ribose) polymerase	PARP1	gi 190167	113.810	327	7	8	DNA repair, Transcription

Histone deacetylase 1	HDAC1	gi 13128860	55,638	319	9	22	Transcription
Telomeric repeat binding factor 2	TERF2	gi 5032169	55,688	302	6	20	Cell cycle
Transcription factor LSF	TFCP2	gi 476099	57,733	244	5	nd	Transcription
<b>Band 6</b>							
NF45	ILF2	gi 532313	44,898	469	11	18	Transcription
Flap structure-specific endonuclease 1	FEN1	gi 54695918	42,908	453	13	31	DNA repair
Vaccinia related kinase 1	VRK1	gi 4507903	45,790	439	12	nd	Cell cycle
DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box polypeptide 48	EIF4A3	gi 13177790	47,126	422	10	27	mRNA metabolism, rRNA processing
HnRNP D	HNRNP D	gi 870743	30,523	394	12	29	Transcription
<b>Band 7</b>							
Apurinic endonuclease	APEX1	gi 178743	35,959	488	14	40	DNA repair, Transcription
Protein phosphatase 1, catalytic subunit, alpha isoform 1	PPP1CA	gi 4506003	38,229	465	9	nd	Cell cycle, Carbohydrate metabolism
Protein phosphatase-1 gamma 1	PPP1CC	gi 484316	37,271	456	9	29	Cell cycle, Carbohydrate metabolism
ELAV-like 1	ELAVL1	gi 38201714	36,240	393	10	30	mRNA stabilization
B23 nucleophosmin (280 AA)	NPM1	gi 825671	31,090	332	13	21	Ribosome assembly, signal transduction, intracellular protein transport
<b>Band 8</b>							
Ribosomal protein L7a	RPL7A	gi 49522232	30,148	421	8	nd	60S ribosomal constituent
N-methylpurine-DNA glycosylase; MPG	MPG	gi 233968	30,005	392	9	33	DNA repair
Histone H1	HIST1H1D	gi 22770675	22,336	323	6	nd	nucleosome structure
Homolog of Yeast RRP4	EXOSC2	gi 12653909	32,996	312	6	nd	rRNA processing
Ribosomal protein S2	RPS2	gi 23491733	25,874	227	5	19	40S ribosomal constituent
<b>Band 9</b>							
High-mobility group box 2	HMGB2	gi 54696428	24,061	389	20	44	DNA repair and recombination
Ribosomal protein L14	RPL14	gi 1620022	23,902	252	6	25	60S ribosomal constituent
Ribosomal protein L13	RPL13	gi 15431297	24,304	225	5	27	60S ribosomal constituent
High mobility group protein B1	HMGB1	gi 48145843	25,035	214	13	nd	DNA repair and recombination, transcription
Ras-related nuclear protein	RAN	gi 48734884	24,609	176	5	22	Cell cycle, protein transport
<b>Band 10</b>							
HMGB3 protein	HMGB3	gi 47124341	23,137	555	35	48	DNA recombination
Cleavage and polyadenylation specific factor 5	NUDT21	gi 12655103	26,268	466	13	30	mRNA processing

Splicing factor, arginine/serine-rich 9	SRSF9	gi 4506903	25.640	386	13	nd	mRNA splicing, processing
HnRNP A1 (Helix-stabilizing protein)	HNRNPA1	gi 47939618	34.273	352	20	nd	mRNA splicing, processing and transport
Protein C2f	EMG1	gi 2276396	26.474	236	4	nd	Ribosome biogenesis
<b>Band 11</b>							
RNA polymerase II subunit	POLR2H	gi 1017823	17.203	198	7	27	Transcription
Ribosomal protein S19	RPS19	gi 12652563	16.051	188	4	nd	40S ribosomal constituent
Histone H1b	HIST1H1B	gi 356168	21.721	158	3	nd	Nucleosome assembly
HIST1H2BN protein	HIST1H2BN	gi 68532407	13.928	156	9	26	Nucleosome assembly
<b>Band 12</b>							
Histone H1	HIST1H1D	gi 22770675	22.336	323	6	nd	Nucleosome structure
HIST1H4I protein	HIST1H4I	gi 45767731	11.332	249	8	S40	Nucleosome assembly
Histone H4	HIST4H4	gi 223582	11.230	235	8	39	Nucleosome
HIST1H2BN protein	HIST1H2BN	gi 68532407	13.928	98	4	nd	Nucleosome

The dataset resulting from mass spectrometry analysis was blasted against NCBI database [NCBI nr 20060525]. The highest scoring proteins identified for each band are listed. Peptide no and % coverage refer to number of MS peptides used in protein identification and the percentage of the total protein sequence covered. The main biological function is also mentioned. nd: not determined.



## 2.7 Figure legends

**Figure 2.1. Experimental design for the isolation and the identification of host proteins associated with HIV-1 IN.** A biotinylated DNA fragment corresponding to part of U3-LTR was immobilized on streptavidin-coupled magnetic beads. Protein extracts from stably HIV-1 IN-expressing 293T cells (293T-IN<sup>s</sup>ala) were incubated with beads. After washing, IN and the associated proteins were eluted, separated on 1D SDS-PAGE, *in situ* trypsin-digested and subjected to liquid chromatography-mass spectrometry analysis.

**Figure 2.2. Elution of IN and the associated proteins with 0.5 M NaCl.** Nuclear extracts from 293T-IN<sup>s</sup>ala cells prepared using the method of (Dignam, Lebovitz et Roeder, 1983) (A) or total extracts prepared according to (Mulder, Chakrabarti et Muesing, 2002) (B) were incubated with the immobilized DNA bait on streptavidin magnetic beads. Following several washes with 0.1M NaCl buffer, IN and the associated proteins were eluted with 0.5M NaCl buffer and resolved by 10% SDS-PAGE. Proteins were analyzed by silver nitrate staining and anti-IN immunoblotting.

**Figure 2.3. Profile of proteins specifically associated with IN.** (A) The eluted protein samples from 293T-IN<sup>s</sup>ala (expressing the integrase) and 293T (negative control) obtained by the magnetic purification were fractionated on SDS-PAGE (4-12%) and visualized by silver nitrate staining. Lines indicate the position of protein bands analyzed by liquid chromatography-mass spectrometry. (B) Western blot analysis of aliquot fractions during purification using antibodies against DDX5, DDX17, HDAC1 and FEN1.



Figure 2.1

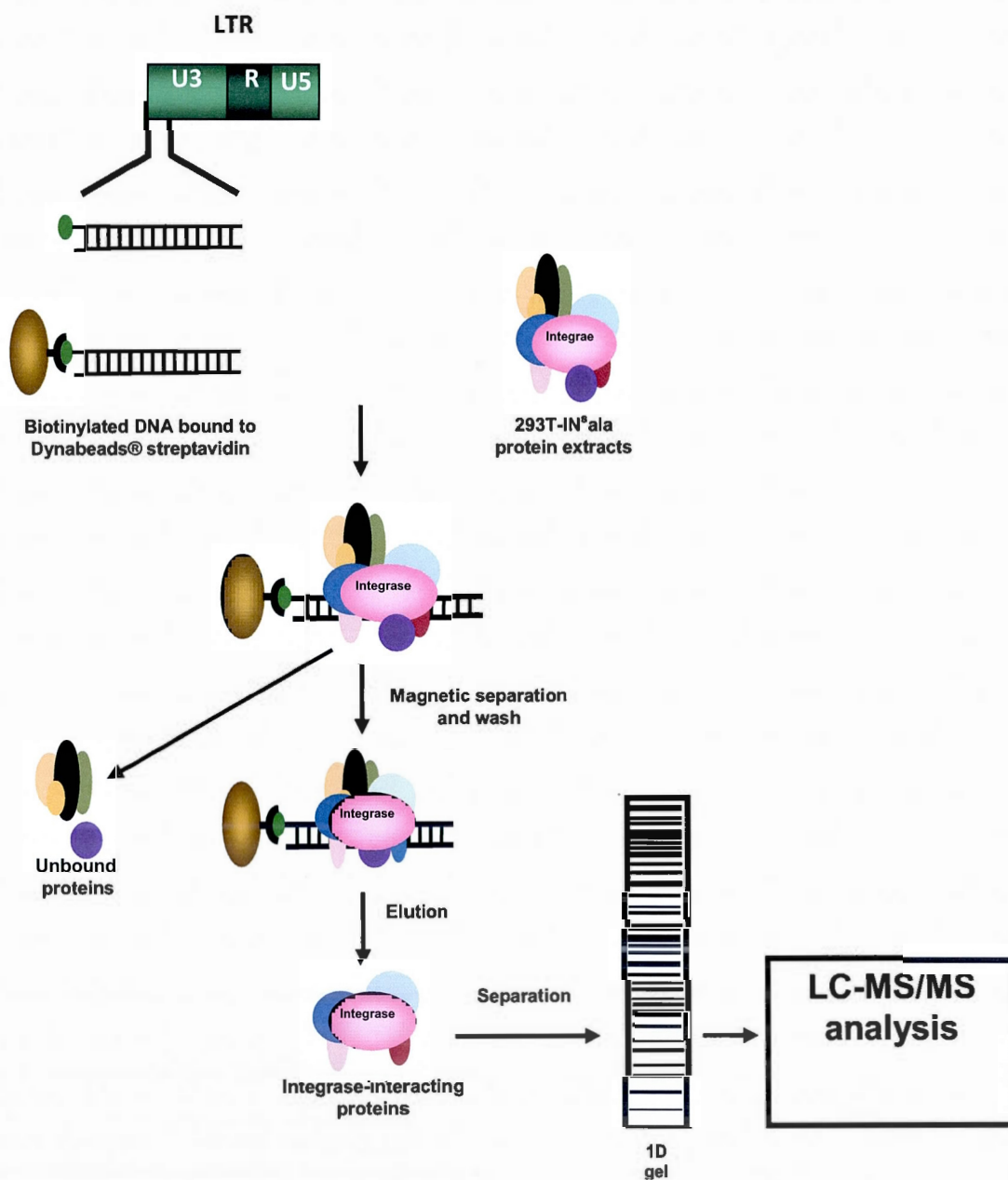


Figure 2.2

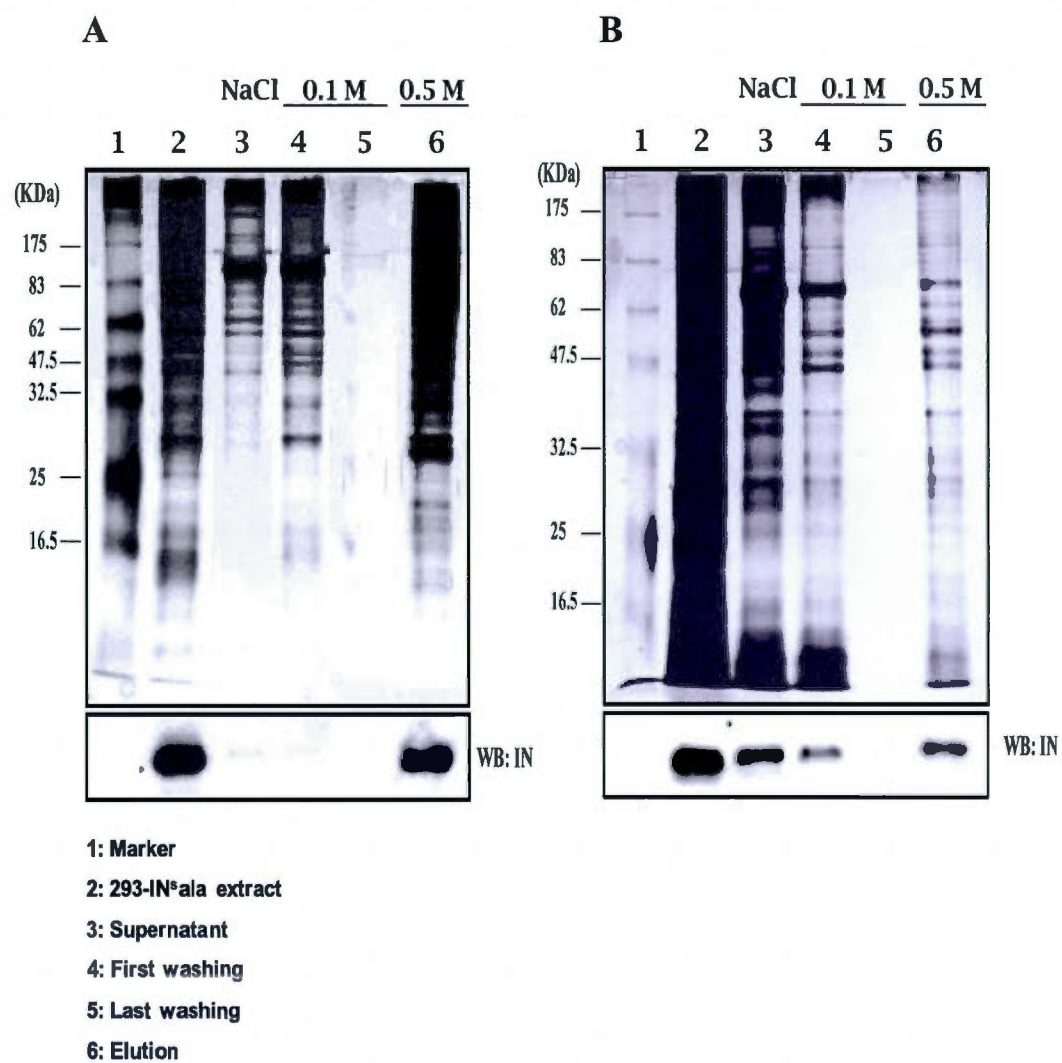
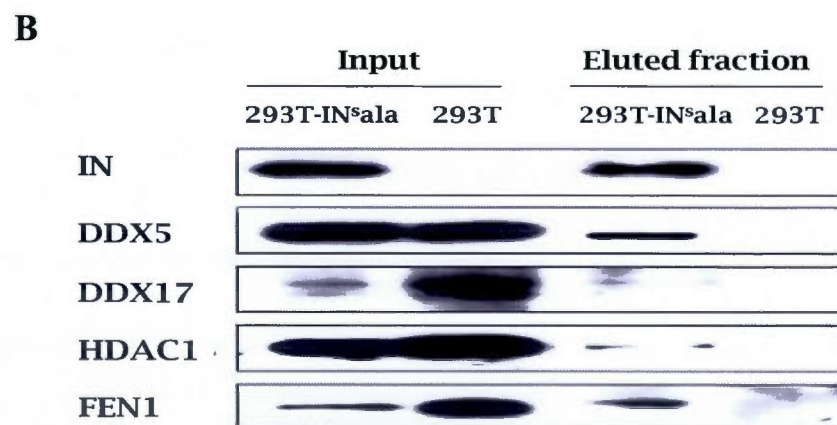
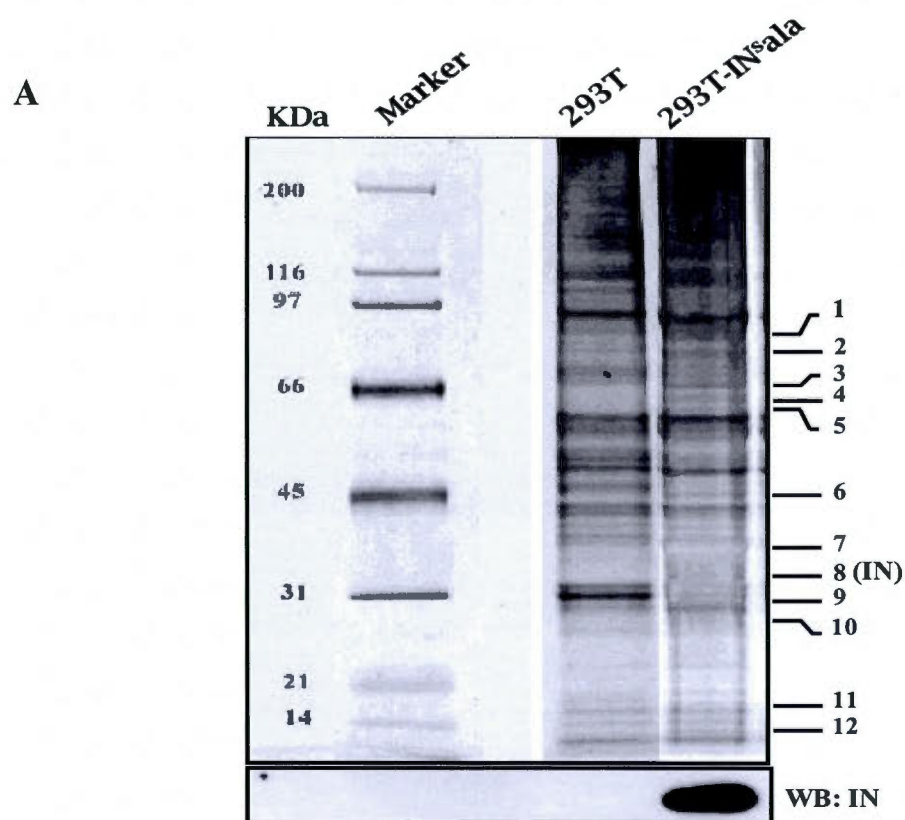


Figure 2.3



### **CHAPITRE III**

**The DDX5 and DDX17 RNA helicases interact with HIV-1 integrase and  
modulate virus replication**

**Fadila Larguet, Christian Trahan, François Dragon, Eric Rassart and Elsy  
Edouard**

**2012**

**Soumis à Journal of Virology**

## Avant-propos

Dans le chapitre II, nous avons appliqué une stratégie expérimentale qui nous a permis d'identifier de nombreuses protéines cellulaires comme partenaires d'interaction potentiels de l'intégrase du VIH-1. Parmi ces protéines figuraient des RNA hélicases, des protéines impliquées dans quasiment tous les aspects du métabolisme de l'ARN; de la transcription jusqu'à la traduction (Janknecht, 2010). Nous savions déjà que certaines RNA hélicases cellulaires jouent un rôle dans la réplication du VIH-1 notamment comme cofacteurs des protéines virales Rev et Gag (Li *et al.*, 1999; Roy *et al.*, 2006 ; Xing, Liang et Kleiman, 2011; Cocude *et al.*, 2003; Fang *et al.*, 2004 ; Robertson-Anderson *et al.*, 2011 ; Yedavalli *et al.*, 2004; Ma *et al.*, 2008). Cependant, c'est la première fois où on découvre une association entre des RNA hélicases et l'intégrase. Nous nous sommes intéressés en particulier aux RNA hélicases DDX5 et DDX17, deux protéines que nous avons identifiées avec un score élevé lors de l'analyse par spectrométrie de masse réalisée dans le chapitre II.

Dans le présent chapitre, nous démontrons l'interaction de l'intégrase du VIH-1 avec les RNA hélicases DDX5 et DDX17. Également, nous mettons en évidence un rôle positif de ces protéines dans la réplication du VIH-1.

Lors de ce travail, Trahan C., sous la direction de Dragon F., a construit les clones FLAG-DDX5 et FLAG-DDX17 qui ont servi à surexprimer les protéines DDX5 et DDX17. Edouard E. a effectué les expériences du pull-down. J'ai moi-même conçu et réalisé le reste des travaux et rédigé le manuscrit. Edouard E. et Rassart E. ont corrigé le manuscrit.

### 3.1 Résumé

Le virus de l'immunodéficience humaine (VIH-1) est capable de détourner la machinerie cellulaire pour sa propre réplication à travers des interactions virus-hôte et une stratégie antivirale en plein essor repose sur l'inhibition de ces interactions. L'intégration de l'ADN viral dans le génome de la cellule hôte est une étape essentielle à la réplication du virus. L'intégrase virale est nécessaire et suffisante pour catalyser la réaction d'intégration *in vitro*. Cependant, l'activité de l'enzyme est modulée *in vivo* par des protéines virales et des protéines cellulaires. En plus de l'intégration, l'intégrase intervient dans d'autres étapes du cycle viral et ses fonctions multiples impliquent l'interaction avec différents facteurs cellulaires dont certains sont déjà identifiés. Dans le présent travail, nous démontrons que l'intégrase du VIH-1 interagit avec deux nouvelles protéines cellulaires, les RNA hélicases DDX5/p68 (DDX5) et DDX17/p72 (DDX17). A l'aide de l'inhibition de leur expression protéique par siRNA ou de leur surexpression, nous mettons en évidence un rôle positif pour ces protéines dans le cas d'une infection à plusieurs cycles. Nos résultats révèlent aussi que ces protéines ont un double rôle au cours de la réplication virale. Nous trouvons que DDX5 facilite une étape précoce située entre l'entrée et l'intégration, probablement au niveau de la transcription inverse, tandis que DDX17 favorise l'intégration. En revanche, les deux protéines exercent un effet négatif dans les étapes qui suivent l'intégration. Par ailleurs, l'inhibition de l'expression de DDX5 ou DDX17 dans les cellules productrices de virus montre que les deux protéines sont nécessaires à l'infectivité virale. Nos résultats sont venus jeter une lumière nouvelle sur le rôle des RNA hélicases à l'interface VIH-1-hôte.

Mots-clés : VIH-1, intégrase, RNA hélicase, DDX5, DDX17, intégration, transcription inverse, infectivité



### 3.2 Abstract

Human immunodeficiency virus type-1 (HIV-1) is able to hijack the cellular machinery for its own replication through interactions between viral and host cell proteins. A rising strategy against HIV-1 infection is to target key virus-cell interactions. HIV-1 DNA integration into the host cell genome is an essential step in the replication of the virus. The viral integrase is necessary and sufficient to catalyze the integration reaction *in vitro*. However, the enzyme's activity is modulated *in vivo* by viral and cellular proteins. In addition to integration, HIV-1 integrase is involved in other steps of viral replication and its multiple functions imply the interaction with different host factors, some of which being already identified. In this study, we provide evidence that the HIV-1 integrase interact with two new cellular proteins, DDX5/p68 (DDX5) and DDX17/p72 (DDX17) RNA helicases. Using siRNA knockdown and overexpression approaches, we demonstrate the facilitating role of these two proteins in HIV-1 replication in a multiple rounds infection system. Furthermore, our results reveal dual and complex roles of DDX5 and DDX17 during HIV-1 replication. We find that DDX5 facilitates a post-entry early event prior to integration, probably at the reverse transcription, while DDX17 promotes integration. In contrast, the two proteins exert a negative control during the post-integration events. Moreover, knockdown of DDX5 or DDX17 in virus producer cells reveals the importance of these proteins for virus infectivity. These results shed new light on the role of RNA helicases at the HIV-1-host interface.

**Keywords :** HIV-1, integrase, RNA helicase, DDX5, DDX17, integration, reverse transcription, infectivity

### 3.3 Introduction

HIV-1 replication requires reverse transcription of the viral genome RNA in linear DNA and its integration into the host cell chromosome *via* a two-step reaction catalyzed by the viral integrase (IN). In the first step, called 3'-processing, a dinucleotide (GT) is released from each 3' end of the viral long terminal repeat (LTR) adjacent to a conserved CA dinucleotide. During the second step, termed strand transfer, the exposed 3'-hydroxyls are used in a nucleophilic attack and become covalently joined to 5'-phosphates in the host DNA to produce the integration intermediate. Finally, the integration is completed by cleavage of unpaired dinucleotides from the 5' ends of viral DNA and repair of single-stranded gaps between viral and host DNA most likely by cellular enzymes (Vandegraaff et Engelmann, 2007). IN is necessary and sufficient for the integration reaction *in vitro* (Bushman, Fujiwara et Craigie, 1990). In infected cells, however, IN functions in the context of the preintegration complex (PIC), a large nucleoprotein structure that contains the linear viral cDNA, viral proteins and cellular factors that play important roles in the integration reaction (Hindmarsh et Leis, 1999a ; Miller, Farnet et Bushman, 1997). Besides integration, HIV-1 IN is involved in different steps of the virus life cycle: uncoating, reverse transcription, PIC nuclear import and viral maturation (Briones, Dobard et Chow, 2010 ; Hehl *et al.*, 2004 ; Ikeda *et al.*, 2004 ; Jayappa *et al.*, 2011 ; Mohammed, Topper et Muesing, 2011 ; Wilkinson *et al.*, 2009 ; Zhu, Dobard et Chow, 2004). Several experimental approaches were used to identify host proteins that interact with IN including *in vitro* reconstitution of salt-stripped PIC activity, yeast two-hybrid system, co-immunoprecipitation and pull-down assays. Several proteins identified using these approaches were shown to physically interact with IN and to affect HIV-1 replication in cell-culture experiments (Vandegraaff et Engelmann, 2007).

To identify new HIV-1 IN-interacting host cell proteins, we developed an *in vitro* system using a portion of U3-LTR as DNA bait and streptavidin-coupled magnetic beads separation followed by mass spectrometry (Larguet *et al.*, in preparation). This system allowed the isolation of known integration cofactors in addition to new cellular proteins. Interestingly, among the new IN cofactor candidates, we identified several RNA helicases including DDX5 and DDX17 with high scores. RNA helicases are proteins that catalyze unwinding of RNA structures in an ATP-dependent manner and are involved in all aspects of RNA metabolism including transcription, mRNA splicing and export, RNA translation and stability, microRNA processing, and ribosome biogenesis. In addition, RNA helicases can perform functions that are independent of their enzymatic activity and play essential roles in a broad array of biological processes (Janknecht, 2010).

Rising evidences demonstrate that host RNA helicases may play an important role during HIV infection. Indeed, Li *et al.* (Li *et al.*, 1999) found that RNA helicase A (RHA) is involved in HIV-1 Rev/RRE-dependent gene expression by releasing unspliced viral mRNA from spliceosomes before splicing completion. In addition, RHA associates with Gag in HIV-1 particles and affects virus assembly and reverse transcription (Roy *et al.*, 2006 ; Xing, Liang et Kleiman, 2011). Another RNA helicase, RH116, was shown to increase unspliced HIV-1 mRNA levels in HeLa cells during infection (Cocude *et al.*, 2003). Other studies also reported that DDX3 and DDX1 RNA helicases regulate Rev/RRE-mediated nuclear export of HIV-1 RNA (Fang *et al.*, 2004 ; Robertson-Anderson *et al.*, 2011 ; Yedavalli *et al.*, 2004). Similarly, DDX24 has been reported to interact with Rev and to regulate viral RNA packaging (Ma *et al.*, 2008). Overall, studies suggested that host RNA helicases act as cofactors of viral proteins, mainly Rev but also Gag. Other HIV-1 proteins including integrase could also appropriate cellular RNA helicases to perform their function.

Here, we report for the first time that HIV-1 integrase interacts with DDX5 and the related DDX17 RNA helicases to facilitate early events in HIV-1 replication. Indeed, we demonstrate, by transient siRNA knockdown and overexpression, that both proteins facilitate HIV-1 replication. We also show that DDX5 and DDX17 are important for HIV-1 virions infectivity. Moreover, we provide evidence that DDX5 and DDX17 exert negative control in the late stages of the HIV-1 replication cycle, suggesting that these RNA helicases may act as regulators of HIV-1 replication.

### 3.4 Materials and methods

#### 3.4.1 Cell culture

293T cells (ATCC) were cultured in Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) containing 10% fetal bovine serum (FBS), 2 mM L-glutamine, 50 U/ml penicillin and 50 µg/ml streptomycin (referred to here as DMEM-complete). 293T-IN<sup>s</sup>ala cells, expressing high levels of HIV-1 integrase from a synthetic gene, were obtained from Dr. Zeger Debyser (Cherepanov *et al.*, 2000) and grown in DMEM-complete supplemented with 200 µg/ml hygromycin B. HeLa-CD4-LTR-β-gal cells (HeLa-CD4) were obtained from Dr. Michael Emerman (Kimpton et Emerman, 1992) through the NIH AIDS Research & Reference Reagent Program. The cells were maintained in DMEM supplemented with 10% FBS, 200 µg/ml G418 and 100 µg/ml hygromycin B. LuSIV cells were obtained through the NIH AIDS Research & Reference Reagent Program from Drs. Jason W. Roos and Janice E. Clements (Roos *et al.*, 2000). LuSIV cells were grown in RPMI medium containing 10% FBS, 2 mM sodium pyruvate, 10 mM HEPES, 2 mM L-glutamine, 50 U/ml penicillin, 50 µg/ml streptomycin and 300 µg/ml hygromycin B.

#### 3.4.2 Virus stocks

HIV-1 virions were produced by transfection of 293T cells with wild type HIV pNL4.3 plasmid. Pseudotyped HIV-Luc virions were generated by co-transfecting pNL4-3.Luc.R-E- and a vesicular stomatitis virus G protein (VSV-G) expression vectors following the calcium phosphate transfection protocol (Cantin *et al.*, 1997) with slight modifications. pNL4.3 plasmid was obtained from Dr. Malcolm Martin (Adachi *et al.*, 1986) and pNL4-3.Luc.R-E- from Dr. Nathaniel Landau (He *et al.*, 1995) through the NIH AIDS Research & Reference Reagent Program. Virus-containing supernatants were harvested 48 hours after the transfection, centrifuged for 5 min at 700 x g, cleared by filtration through 0.22 µm pore-size filters, aliquoted and

stored at  $-80^{\circ}\text{C}$ . Virus stocks were assayed for virion content by using an in-house double-Ab sandwich ELISA specific for the viral p24<sup>gag</sup> protein as described (Bounou, Leclerc et Tremblay, 2002). Recombinant HIV-1 p24 protein and anti-p24 antibodies used for the p24 ELISA were precious gifts from Dr. Michel Tremblay (Laval University, Québec, Canada) (Bounou, Leclerc et Tremblay, 2002). Before each infection experiment, the virus inoculum was treated with DNase I (1  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) in the presence of  $\text{MgCl}_2$  (1 mM) for 30 minutes at  $37^{\circ}\text{C}$  to remove contaminating DNA.

### **3.4.3 HeLa-CD4 infection**

The cells ( $8 \times 10^4$  -  $10^5$ ) were plated in 24-well plates and transfected with siRNAs/expression vectors. The infection was initiated 48h after the transfection by adding HIV-1 or HIV-Luc virions (10 or 30 ng p24 per well) to cells in a 300  $\mu\text{l}$  total volume of infection medium (DMEM, 10% FBS, 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  G418, 50  $\mu\text{g}/\text{ml}$  hygromycin B) containing 8  $\mu\text{g}/\text{ml}$  polybrene. The medium was removed 3 hours after initiating the infection and cells were washed and grown in fresh medium.

### **3.4.4 LuSIV infection**

The cells were grown overnight in the presence of 2  $\mu\text{g}/\text{ml}$  polybrene then plated at  $1 \times 10^5$  cells/well in 24-well plates. 20 ng of p24 HIV-1 virions were used to infect LuSIV cells in 500  $\mu\text{l}$  total volume.

### **3.4.5 Plasmids**

The vectors used to express FLAG-DDX5 and FLAG-DDX17 proteins were constructed as follows. The sequences corresponding to the open reading frames (ORFs) of DDX5 and DDX17 were amplified by PCR from a cDNA library derived from a human Namalwa (Burkitt lymphoma) cell line (Strubin, Newell et Matthias, 1995). Site-directed mutagenesis was carried out to introduce a silent mutation



(A1158G) in the ORF of DDX5 to disrupt the EcoRI restriction site. Oligonucleotides used for the amplification of mutagenized DDX5 were EcoRI-DDX5-s (5'-CCGGAATTCATGTCGGGTATTTCGAGTGAC-3'), DDX5-mut-s (5'-CTAAATGAGTTCAAACATGGAAAAGCTCC-3'), DDX5-mut-as (5'-CCATGTTTGAGTTCATTTAGAACCCAGTC-3') and EcoRI-DDX5-as (5'-CCGGAATTCTTATTGGGAATATCCTGTTGGC-3'). The oligonucleotides used to amplify DDX17 ORF were EcoRI-DDX17-s (5'-CCGGAATTCATGCGCGGAGGAGGCTT-3') and EcoRI-DDX17-as (5'-CCGGAATTCTCATTACGTGAAGGAGGAGGA-3'). Amplicons of DDX5 and DDX17 were digested with EcoRI and cloned into the corresponding site of the mammalian expression vector pBact-FLAG to generate pFLAG-DDX5 and pFLAG-DDX17, respectively; these plasmids encode N-terminally FLAG-tagged proteins. The pBact-FLAG vector was derived from pBact-myc (Cravchik et Matus, 1993), which was cleaved with HindIII to remove the small DNA fragment encoding the myc tag. This piece of DNA was replaced by another one encoding the FLAG tag, following the shot-gun ligation method (Grundstrom *et al.*, 1985) with oligonucleotides FLAG-top1 (5'-AGCTTCGGACCATGGACTACAAAGAC-3'), FLAG-top2 (5'-GATGACGATAAAGCAGAATTCATCGATA-3'), FLAG-bottom1 (5'-GTCATCGTCTTTGTAGTCCATGGTCCGA-3') and FLAG-bottom2 (5'-AGCTTA TCGATGAATTCTGCTTTATC-3'). The integrity of all constructs was verified by automated sequencing at the Génome Québec Innovation Centre. To generate DDX5-His and DDX17-His expressing vectors, the ORFs were subcloned from pFLAG-DDX5 and pFLAG-DDX17, respectively, into the EcoRI site of pTrcHis (B). It is important to note that the pFLAG-DDX17 and DDX17-His vectors both expressed the p72 but not the p82 isoform.

### 3.4.6 siRNAs

All siRNAs used in this study were purchased from Qiagen: Hs\_DDX5\_10 (Cat no SI04178293), Hs\_DDX5\_13 (Cat no SI04294486), Hs\_DDX17\_4 (Cat no SI00361018), Hs\_DDX17\_7 (Cat no SI04223198) and control GFP-22 siRNA (Cat no 1022064). siRNA transfection was carried out using the HiPerFect transfection reagent (Qiagen) according to the manufacturer instructions.

### 3.4.7 Immunoprecipitation experiments

293T-IN<sup>s</sup>ala and 293T (negative control) cells were seeded ( $1 \times 10^6$  cells per 60 mm plate) and transfected or not with 4  $\mu$ g p-FLAG-DDX17 plasmid using polyFect reagent (Qiagen). Cells were washed 48 h after the transfection and lysed with chilled modified RIPA buffer (50 mM Tris-HCl pH 7.4, 150 mM NaCl, 1% NP40, 0.25 % Sodium deoxycholate, 1 mM EDTA, 1 mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>, 1 mM NaF) containing complete protease inhibitor (Roche Applied Science) followed by centrifugation at 10,000 x g for 15 min to pellet cellular debris. For immunoprecipitations, 400  $\mu$ g of total cell extracts were incubated with specified antibodies at 4°C for 1h. Thereafter, Protein G-sepharose beads (Invitrogen) were added and incubation continued overnight at 4°C with rotation. Immunoprecipitates were washed four times with modified RIPA buffer, then eluted in 2X electrophoresis sample buffer and resolved by 10% SDS-PAGE. The following antibodies were used for immunoprecipitation experiments: rabbit HIV-1 HXB2 integrase antisera obtained from Dr. Duane P. Grandgenett (Grandgenett et Goodarzi, 1994) (NIH AIDS Research & Reference Reagent Program, cat. no. 757 and no. 758) and rabbit polyclonal anti-FLAG (Sigma, Cat no F7425). Western blot analysis was carried out using a mixture of HIV-1 IN 8G4 and 2C11 monoclonal antibodies from Dr. Dag E. Helland (Nilsen *et al.*, 1996) (from NIH AIDS Research & Reference Reagent Program), and anti-FLAG-M2 monoclonal antibody (Sigma, Cat no F1804). The monoclonal anti-DDX5, C10, was a generous gift from Dr. Hans Stahl (Uhlmann-Schiffler, Rossler et Stahl, 2002).

### 3.4.8 Purification of recombinant His-tagged proteins and affinity pull-down assays

DDX5 and DDX17 were expressed as His6-tag fusion proteins from pTrcHis vector. The expression of the desired protein was induced on exponentially growing bacteria *E. Coli* (DH10B) expressing the desired protein were induced with 1 mM IPTG during 4h at 37°C. The cells were harvested by centrifugation at 10,000 x g for 10 min and lysed in lysis buffer (50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> pH 7.0, 0.5% Tween 20, 0.5% Triton X-100, 0.5% NP40, 1% SDS, 1mg/ml lysozyme and 1µg/ml benzonase; 1 to 2g wet weight/5ml of buffer) during 30 min on ice. After sonication, the lysates were clarified by centrifugation at 16,000 x g for 20 min at 4°C. Clarified lysates were incubated with the Ni-NTA His.Bond® superflow resin (Novagen) equilibrated in a Ni-NTA buffer [50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> buffer pH 8.0, 150 mM NaCl and complete protease inhibitor (Roche Applied Science)] with 30 mM imidazole during 2h at 4°C, with gentle rocking. The beads were then loaded into a column and washed with 10x the column volumes of the same buffer. His-tag proteins were eluted with 250 mM imidazole in Ni-NTA buffer. Aliquot fractions at each step (flow through, washes and elution) were separated on 10% SDS-PAGE and stained by Coomassie blue. The protein-containing fractions were pooled and dialyzed against 20 mM HEPES pH 7.5, 1 mM DTT, 1 mM EDTA, 0.5 M NaCl and 10% glycerol. For affinity pull-down assays, Ni-NTA His.Bond® superflow resin (50 µl) was incubated with 1µg of purified recombinant HIV-1<sub>NL4-3</sub> IN, obtained from Dr. Robert Craigie (Li et Craigie, 2005) (NIH AIDS Research & Reference Reagent Program) and 5 µg of Ni-NTA purified DDX5-His or DDX17-His during 2h at 4°C with Ni-NTA buffer containing 30 mM imidazole. After 4 washes, bound proteins were eluted with 250 mM imidazole in Ni-NTA buffer, analyzed by 10% SDS-PAGE and western blot using indicated antibodies.

### 3.4.9 Transient knockdown/overexpression and time course infection

HeLa-CD4 cells ( $8 \times 10^4$ ) were plated in 24-well plates and transfected 24h later with siRNAs (15 nM) or expression vectors (375 ng). Infection was initiated 48h after transfection by adding HIV-1 virions (10 ng p24 per well) to cells. At different time points post infection, cell free supernatants were harvested and aliquots stored at  $-80^{\circ}\text{C}$  until tested for virion content and infectivity. In parallel, cells were harvested for DNA and RNA extraction and further analysis. To monitor HIV-1 replication kinetics, virion production was measured by quantification of p24 antigen by ELISA. The experiments were performed in triplicate. For transient overexpression experiments, transfection was performed using pFLAG-DDX5 or pFLAG-DDX17 with polyFect reagent (Qiagen). The empty vector pBact-FLAG, referred to here as Mock, was used as control. The expression of FLAG-tagged proteins was analyzed by western blot using anti-FLAG-M2 monoclonal antibody (Sigma).

#### **3.4.10 Transient knockdown and single round infection**

HeLa-CD4 cells were seeded in 24-well plates and transfected with 20 nM siRNAs. Infection was initiated at 48h post-transfection with HIV-1 virions (30 ng p24 of per  $1 \times 10^5$  cells) as described above. HIV-1 infection was measured by quantification of luciferase activity in cell lysates 48h after the infection. Cells were also harvested at 48h postinfection (pi) for viral DNA analysis.

#### **3.4.11 Quantitative RT-PCR gene expression analysis**

At different time points after siRNA transfection, total RNA was isolated with TRizol reagent (Invitrogen) and 2.5 to 5  $\mu\text{g}$  of each RNA sample was subjected to reverse transcription (RT) using Omniscript RT kit (Qiagen) and oligo(dT) primer. The amounts of cDNAs for DDX5, DDX17 and  $\beta$ -actin mRNAs were quantified by using SYBR Green Master Mix (Takara Bio, Inc.) and a LightCycler (Roche Diagnostics). The reaction was carried out in 10  $\mu\text{l}$  final volume containing 1.25-2.5 ng of cDNA, SYBR Green, 0.5  $\mu\text{M}$  of DDX5, DDX17 or  $\beta$ - actin primers. The



primers pairs used were: DDX5-sense: 5'-CAAGTTGCTTCAGTTGGTCG-3'  
 DDX5-antisense: 5'-TCTCTTTTAAGCAGGCTAGAGTAAC-3' DDX17-sense: 5'-  
 GTGTTGAGATCTGCATAGCCACTCC-3' DDX17-antisense: 5'-  
 ACTCCACATCAGTGTCTGCCTATCA-3'  $\beta$ -actin-sense: 5'-  
 GGGTCAGAAGGATTCCTATG-3'  $\beta$ -actin-antisense: 5'-  
 GGTCTCAAACATGATCTGGG-3' The cycling conditions were as follows: initial  
 denaturation at 95°C for 10 sec followed by 50 cycles of amplification (denaturation  
 at 95°C for 5 sec, amplification at 60-62°C for 20 sec and elongation at 72°C for 15  
 sec). Data were analyzed with Real Quant Software (Roche Applied Science).

#### 3.4.12 MTS/PMS assay

The MTS/PMS assay was used to determine cell viability upon siRNA transfection at 24, 48 and 72 hours post transfection. The cells, cultured in 24-well plates, were washed and 400  $\mu$ l of fresh medium were added per well and allowed to equilibrate for 1 hour at 37°C. A freshly combined solution of phenazine methosulfate (PMS, Sigma) and Tetrazolium salt [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium (MTS, Promega) was added at 80  $\mu$ l/well to obtain final concentrations of 25  $\mu$ M and 333  $\mu$ g/ml of PMS and MTS, respectively. After 1 h of incubation at 37°C in a humidified, 5% CO<sub>2</sub> atmosphere, the absorbance of the product (formazan) was recorded at 490 nm using an ELISA plate reader.

#### 3.4.13 Quantification of HIV-1 DNA species

DNA samples were isolated from infected HeLa-CD4 cells using FlexiGene DNA Kit (Qiagen). All HIV-1 DNA species were quantified by qPCR as described by Suzuki et al. (Suzuki *et al.*, 2003) with some modifications. Briefly, integrated viral DNA was measured by nested Alu PCR. The first round PCR was performed with 10 ng of cell DNA using an Alu-sequence-specific primer Alu-sense and a HIV-

1 specific antisense primer M661. The second round qPCR was performed with a 500-fold diluted aliquot of the first round PCR product for the amplification of R/U5 viral DNA portion using the sense primer M667 and the antisense primer AA55. Quantification of 2-LTR circles was performed using the sense primer 2-LTR-S and the antisense primer 2-LTR-AS on 50 ng cell DNA. The late RT transcripts were measured using the sense primer LG564 and the antisense primer LG699 on 10 ng cell DNA. The total viral cDNA was quantified from 1-10 ng cell DNA with the M667 and AA55 primers (mentioned above). For each quantification, human  $\beta$ -globin DNA was quantified as an internal control with a globin sense primer (globin-s) and a globin antisense primer (globin-as). Each sample was run in triplicate. Controls with no template DNA in the PCR mixture were run with each experiment. DNA extracted from non-infected HeLa-CD4 cells was run with each experiment and used to subtract background amplification. All PCR amplifications were performed using the Roche LightCycler and a SYBR Green Master Mix (Takara Bio Inc.). For each qPCR, a standard curve of the amplicon being measured was performed. The cycling conditions included initial denaturation at 95°C for 10 min followed by 50 cycles of amplification (denaturation at 95°C for 15 sec and amplification at 60°C for 1 min). The amount of DNA in each measurement was chosen so as to ensure that the amplification is within the dynamic range of the standard curve. The primer sequences were as follow: Alu-sense: 5'- TCCCAGCTACTCGGGAGGCTGAGG-3'

M661:	5'-CCTGCGTCGAGAGATCTCCTCTG-3';	M667:	5'-
	GGCTAACTAGGGAACCCACTGC-3';	AA55:	5'-
	CTGCTAGAGATTTTCCACACTGAC-3';	2-LTR-S:	5'-
	CCCTCAGACCCTTTTAGTCAGTG-3';	2-LTR-as:	5'-
	TGGTGTGTAGTTCTGCCAATCA-3';	LG564:	5'-
	CCGTCTGTTGTGTGACTCTGGT-3';	LG699:	5'-
	GAGTCCTGCGTCGAGAGATCT-3';	globin-s:	5'-
	CCCTTGGACCCAGAGGTTCT-3';	globin-as	5'-
	CTCACTCAGTGTGGCAAAGGTG-3'.		



#### 3.4.14 Luciferase assay

Cells cotransfected with the HIV NL4-3.Luc.R-E- and VSV-G plasmids were lysed 24 hours after transfection while the infected cells were lysed 48 hours after the infection. The cells were resuspended in lysis buffer [25 mM Tris-H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> pH 7.8, 2 mM DTT, 1% (v/v) Triton X-100, 10% (v/v) glycerol] and shaken for 30 min at room temperature then subjected to one freeze-thaw cycle. To 20 µl lysate, 100 µl of the luciferase assay substrate [20 mM Tricine, 1.07 mM (MgCO<sub>3</sub>)<sub>4</sub>·Mg(OH)<sub>2</sub>·5H<sub>2</sub>O, 2.67 mM MgSO<sub>4</sub>, 0.1 mM EDTA, 270 µM coenzyme A, 470 µM D-luciferin, 530 µM ATP, and 33.3 mM DTT] (Fortin *et al.*, 1997) were added and luciferase activity was measured on a Dynex MLX microplate luminometer (Dynex Technologies). Luciferase activity, expressed as relative light units (RLU), was normalized to the protein content of the cell lysates, measured with Bradford reagent (Bio-Rad).

#### 3.4.15 Statistical analysis

Statistical analysis was performed using GraphPad Prism Software. Differences between groups were examined for statistical significance using the Student's *t*-test. Results were considered significant when  $P < 0.05$ .

### 3.5 Results

Using a U3-LTR biotinylated fragment as DNA bait and a streptavidin magnetic bead separation coupled with mass spectrometry, we co-purified HIV IN with known cofactors as well as several cellular proteins with a potential as integrase partners (Larguet *et al.*, in preparation). Among the new IN cofactor candidates identified, two related RNA helicases, DDX5 and DDX17, retained our attention because of their high scores in the mass spectrometry analysis and the emerging importance of RNA helicases in HIV infection. Therefore, we decided to further investigate their interaction with integrase and their role in HIV replication.

#### 3.5.1 DDX5 and DDX17 specifically interact with HIV-1 integrase

We first investigated the interaction of DDX5 and DDX17 with HIV-1 IN by co-immunoprecipitation. Lysates from 293T-IN<sup>s</sup>ala cells (stably expressing HIV-1 IN) or 293T cells (negative control) were subjected to immunoprecipitation using anti-IN polyclonal antibodies then probed with an anti-DDX5 monoclonal antibody. As shown in Figure 3.1A, endogenous DDX5 could be detected in 293T-IN<sup>s</sup>ala but not in 293T samples, indicating that this protein specifically interacts with HIV-1 IN. Similarly, a co-immunoprecipitation experiment carried out with lysates from 293T-IN<sup>s</sup>ala and 293T cells transfected with a vector expressing FLAG-DDX17 showed interaction with HIV-1 IN (Fig. 3.1B). Pull-down assays, carried out with purified proteins IN, DDX5-His and DDX17-His confirmed the interactions and revealed that IN directly interacts with both DDX5-His and DDX17-His (Fig 3.1C, D).

#### 3.5.2 Transient knockdown of DDX5 and DDX17 negatively modulates HIV-1 replication

We used a siRNA-mediated knockdown to analyze the impact of DDX5 and DDX17 on HIV-1 replication. HeLa-CD4 cells were transfected with siDDX5, siDDX17, or siControl and infected 48 hours later with equal amounts of replication-

competent HIV-1 NL4.3 particles. The time course of viral infection was measured p24 release in culture supernatants with ELISA at day 1, 2, 3, 5 and 8 pi.

The results showed a significant delay of HIV-1 replication in both siDDX5- and siDDX17-treated cells compared to control cells (Fig. 3.2A). Inhibition effects were particularly prominent on day 5 pi where DDX5 and DDX17 silencing produced a 6.5-fold and 2-fold inhibition of HIV-1 replication, respectively. Subsequently, the inhibition becomes less important likely, because of siRNAs loss. Indeed, when the efficiency of siRNA treatments was analyzed by qPCR at 2, 5 and 7 days after siRNA transfection, a moderate reduction of DDX5 (44-55%) and DDX17 (44-69%) mRNA levels were observed with a knockdown maximum between 3 and 5 days post transfection for siDDX5 and at day 3 for siDDX17 (Fig. 3.2B, C). In parallel, cell viability monitoring for three days after the siRNA transfection revealed no cytotoxic effects at the concentrations used (Fig. 3.2D, E). Similar results on HIV replication were obtained using a different set of siRNAs targeting either DDX5 or DDX17 (data not shown). Overall, our results indicate a positive modulation of both DDX5 and DDX17 in HIV-1 replication in the context of multiple rounds of infection.

To provide further evidence for the specific modulation of HIV-1 replication by DDX5 and DDX17, the overexpression effect of these proteins was investigated. HeLa-CD4 cells were transfected with p-FLAG-DDX5, p-FLAG-DDX17 vectors or with the empty vector pBact-FLAG (Mock), infected 48h after transfection and virus production was measured by p24 ELISA on day 6 post-infection. As shown in figure 3, overexpression of DDX5 and DDX17 proteins (Fig. 3.3B) increased virus production by 1.5- and 2-fold, respectively, compared to mock-transfected cells (Fig.3A). These results, together with those obtained with siRNA silencing (See Fig. 3.2A) suggest that DDX5 and DDX17 facilitate HIV-1 replication and spread.

### **3.5.3 Transient knockdown of DDX5 affects HIV replication before integration**

Our results indicate that DDX5 and DDX17 interact with HIV-1 integrase and facilitate virus replication. These findings prompted us to further investigate the involvement of these host proteins in the integration process. Viral DNA species (total, late RT, 2-LTR circles and integrated DNAs) were quantified from samples of siDDX5 and siControl HeLa-CD4 treated cells during the course of HIV pNL4.3 infection (Fig. 3.2). Overall, similar levels of all viral DNA species were measured in DDX5-KD and control cells before 72h pi (Fig. 3.4A-D). However, at 72h pi, we observed a significant reduction (40%) in late RT transcripts (Fig. 3.4B) and a proportional reduction (40%) in integrated viral DNA (Fig. 3.4C) in DDX5-KD cells, while no significant difference was observed for the 2-LTR levels (Fig. 3.4D). These results indicate that the decrease in integration levels in DDX5-KD cells is likely the result of the decreased late RT levels. The viral replication in DDX5-KD cells is probably affected at a post-entry step prior to integration, likely at the reverse transcription step.

#### **3.5.4 Transient knockdown of DDX17 affects HIV integration**

We performed a similar analysis of samples from infected DDX17-KD HeLa-CD4 cells (Fig. 3.2). The prominent effect of siDDX17 was noticed at 72h pi where we observed a drastic increase of total viral DNA and 2-LTR circle levels (Fig. 3.5A, D). This increase was concomitant with a drop of integrated viral DNA levels compared to the control (Fig. 3.5C). These results suggest that down regulation of DDX17 affected HIV-1 replication during integration. Furthermore, no significant difference in total viral DNA or late RT (Fig. 3.5A, B) was observed between siDDX17 and siControl treated cells at early hours (12h pi), indicating that DDX17 has no effect on steps before or at viral DNA synthesis. This result also indicates that DDX5 and DDX17, while related to each other, exert distinct functions in HIV replication.

### **3.5.5 Transient knockdown of DDX5/DDX17 in target cells has multiple effects in the HIV-1 cycle**

Since we used a replication-competent virus in these experiments, two cycles of infection are likely to occur within the 72 hours. Furthermore, as partial knockdown of DDX5 and DDX17 was maintained during this period (as shown in Fig. 3.2B and C), the effects observed in DDX5-KD or DDX17-KD cells could be in fact the sum of the effects of respective siRNAs in both producer and target cells. To distinguish these two aspects, we used a VSV-G pseudotyped HIV-NL 4.3.Luc.R-E virus capable of a single round infection, to infect siDDX5 and siDDX17 treated HeLa-CD4 cells. At 48h post infection, quantification of the integrated viral DNA revealed a 40% decrease in DDX5-KD cells compared to control cells (Fig. 3.6A). The effect was even more pronounced with DDX17 knockdown (more than 80% reduction). Total viral DNA was measured at the same time and no significant differences between DDX5-KD or DDX17-KD and control cells were noticed (Fig. 3.6B). These results, in accordance with those obtained in multiple infection conditions, clearly show that DDX5 and DDX17 knockdown of results in the diminution of integrated viral DNA levels. We also determined the effect of siRNA treatment on viral expression by measuring luciferase activity. A significant difference was observed between siControl and specific siRNA (siDDX5 or siDDX17) treated cells (Fig. 3.6C). However, the decrease in luciferase activity was not as important as expected based on the observed decrease in integrated DNA levels (Fig. 6A), suggesting an opposite effect of siDDX5 and siDDX17 treatment on viral protein expression.

To further confirm these results, HIV-1 NL4-3.Luc.R-E- and VSV-G plasmids were cotransfected into siDDX5- or siDDX17-treated HeLa-CD4 cells to by-pass early steps of replication including the integration. As expected, quantification of luciferase activity at 24h post transfection revealed that DDX5 siRNA and to a greater extent DDX17 siRNA treatment promoted viral protein expression (Fig.



3.7A). Similar results were obtained when the same experiment was performed into siDDX5 or siDDX17 treated 293T cells as revealed by luciferase activity (Fig.3.7B) and virus production (p24 release) (Fig. 3.7C) quantifications. Overall, these results indicate that viral protein expression and virus production are enhanced in the absence of DDX5 or DDX17, when integration is by-passed.

### **3.5.6 Cells knocked down for DDX5 and DDX17 produce non infectious viruses**

To reconcile the last results (Fig. 3.7C) with those obtained in the multiple rounds infection system (Fig. 3.2A), we analyzed the infectivity of virions produced by DDX5- or DDX17-KD cells. Equal amounts of VSV-G pseudotyped NL4-3.Luc.R-E- virions produced from siRNAs treated 293T cells were used to infect HeLa-CD4 cells. Luciferase activity measured at 48h pi revealed that virions produced by siDDX5 and siDDX17 treated 293T cells were respectively 3-fold and 1.5-fold less infectious than those produced by control cells (Fig. 3.8A). Similar results were obtained using virions produced by siRNA-treated HeLa-CD4 cells in the multiple rounds infection. Indeed, virions produced at 3 days post infection (See Fig. 3.2A) were normalized to p24 antigen content and used to infect LuSIV cells, a T-cell line bearing a luciferase reporter construct. Luciferase activity quantification revealed that knockdown of DDX17 and to a greater extent of DDX5 affects virus infectivity (Fig. 3.8B). Altogether, these data indicate that the presence of DDX5 and DDX17 are required for the generation of infectious HIV-1 particles.



### 3.6 Discussion

In the present study, we report for the first time that DDX5 and DDX17 RNA helicases interact with HIV-1 integrase. Depletion and overexpression of these proteins revealed their role in facilitating HIV-1 replication. In addition, our study shows that DDX5 and DDX17 are involved in both early and late events of the HIV-1 life cycle. In fact, we found that DDX5 silencing results in a block at a post-entry step prior to integration, probably at reverse transcription, while DDX17 silencing causes a defect at the integration step. In contrast, DDX5 and DDX17 exert a negative control on post-integration step(s) of HIV-1 replication and affect viral protein expression and virus production. Those effects are particularly evident when the integration step is by-passed. Moreover, we provided evidence that these proteins are necessary in virions producer cells to generate infectious progeny.

Recently, Naji et al. (Naji *et al.*, 2012) showed that DDX5 and DDX17 interact with HIV-1 Rev and affect virus replication. The authors found that while silencing of DDX17 inhibits HIV-1 production, silencing of DDX5 increased virion production as well as infectivity. Our data are not in agreement with their findings regarding the impact of DDX5 on HIV replication. In our study, using different approaches (RNA interference and protein overexpression), we demonstrated that DDX5 positively impacts HIV-1 replication. Moreover, we showed that DDX5 positively modulates early events of HIV-1 replication in both single round and multiple rounds of infection systems and that DDX5 is required for infectivity.

We found that DDX5 and DDX17 RNA helicases can interact with HIV integrase. The data with regard to DDX5 was not so surprising since it has already been shown that DDX5 interacts with MuLV integrase in a yeast two-hybrid screen (Studamire et Goff, 2008). Moreover, DDX5 was previously identified as interacting with HIV-1 Rev (Bushman *et al.*, 2009). Although HIV-1 integrase and Rev were shown to interact (Rosenbluh *et al.*, 2007), it is evident that DDX5-Rev interaction is

not mediated by integrase in the system described by Naji et al. Similarly, Rev does not mediate DDX5-integrase interaction since we found that the two proteins can interact with each other in the absence of Rev. Further studies will be needed to elucidate the precise role of DDX5 regarding Rev but we clearly showed that DDX5 positively impacts HIV-1 replication.

HIV-1 integrase interacts with reverse transcriptase and facilitates reverse transcription (Dobard, Briones et Chow, 2007 ; Wilkinson *et al.*, 2009). Thus, it is possible that, through its interaction with integrase, DDX5 can affect reverse transcription especially since it is known to be a nucleocytoplasmic shuttling protein (Wang *et al.*, 2009). DDX5 involvement in virus replication has been shown for hepatitis C virus at a step equivalent to reverse transcription. Indeed, Goh et al. (Goh *et al.*, 2004) reported that the hepatitis C virus NS5B protein, an RNA dependent RNA polymerase, interacts with DDX5 and leads to its relocation from the nucleus to the cytoplasm. The authors suggested that DDX5 is recruited by NS5B to facilitate the transcription from the positive-strand viral RNA.

DDX5 harbors both ATP-dependent helicase and RNA unwinding activities to catalyze rearrangement of secondary structures in RNA as rRNA remodelling during ribosome biogenesis reviewed in (Janknecht, 2010). DDX5 can also function irrespective of its helicase activity to perform different functions in the cell through protein-protein or protein-RNA interactions (Janknecht, 2010). Thus, two assumptions can be proposed to explain the effect of DDX5 on HIV-1 late reverse transcription. First, DDX5 protein could be recruited in the cytoplasm by HIV-1 integrase to facilitate the reverse transcription through its helicase activity to unwind viral RNA structures. The RNA helicase A (RHA) provides an example of a host helicase facilitating the viral reverse transcription. It was shown recently that RHA, in cooperation with HIV-1 Gag, enhanced the annealing of tRNA<sub>3</sub><sup>Lys</sup> to viral RNA by inducing conformational changes in the viral RNA. This cooperation, which occurs in

the virus-producing cells, facilitates the initiation of the reverse transcription in infected cells (Xing, Liang et Kleiman, 2011). Interestingly, DDX5 and RHA have been reported to interact with each other in co-immunoprecipitation experiments (Wilson et Giguere, 2007). Both proteins may contribute to reverse transcription, RHA at the early steps and DDX5 probably in the latest steps of the reaction.

The second assumption is that DDX5, *via* its interaction with HIV-1 integrase, could act by recruiting other proteins that may directly or indirectly promote the reverse transcription. A number of integrase-interacting factors including INI1 and Gemin2 have been reported to act in a similar way (Hamamoto *et al.*, 2006 ; Nishitsuji *et al.*, 2009 ; Sorin *et al.*, 2006). Besides its involvement in RNA metabolism, DDX5 functions as a transcription co-regulator and interacts with CBP/p300 acetyl transferase that acetylates lysine residues in histone and non histone proteins (Rossow et Janknecht, 2003). DDX5 also binds the histone deacetylase 1 (HDAC1) that antagonizes the action of CBP/p300 (Wilson *et al.*, 2004). Interestingly, it was shown that HIV-1 integrase can be acetylated by p300 on three lysine residues (K264, K266 and K273) (Cereseto *et al.*, 2005) although requirement of this modification for integrase activity is still controversial (Cereseto *et al.*, 2005 ; Topper *et al.*, 2007). On the other hand, HDAC1 was reported to be associated with HIV-1 integrase and again there are discrepancies regarding the role of HDAC1 in HIV-1 early steps depending on whether HDAC1 is down regulated in virus-producing cells or in infected cells (Allouch *et al.*, 2011 ; Sorin *et al.*, 2009). The association between HDAC1 and DDX5 has been shown to be regulated by post translational modifications of DDX5. While sumoylation (K53) and acetylation (K32, K33, K40, K43, K44, K45) enhance the interaction of DDX5 with HDAC1 (Jacobs *et al.*, 2007 ; Mooney *et al.*, 2010a), DDX5 phosphorylation (Y593) seems to cause HDAC1 dissociation (Carter *et al.*, 2010). Furthermore, it was suggested that phosphorylated DDX5 competes with HDAC1 and displaces it from certain gene promoters (Carter *et al.*, 2010). Thus, it is reasonable to propose that, depending on

the post translational modification occurring, DDX5 is recruited into different protein complexes (CBP/p300, HDAC1/Sin3a or others) to modify HIV-1 integrase, therefore regulating its activity or interactions. This would be a manner by which integrase co-opts cellular factors to facilitate reverse transcription. Further investigations are certainly required to elucidate the mechanism of action of DDX5 during HIV-1 reverse transcription.

Our results also show that DDX5 as well as DDX17 appear to negatively regulate viral infection in the late stages when integration is by-passed, in contrast to their facilitating role in early events of HIV-1 infection. Gao and co-workers (Chen *et al.*, 2008 ; Zhu *et al.*, 2011) reported that DDX17 but not DDX5 interacts with the zinc-finger antiviral protein (ZAP) that inhibits HIV-1 replication by promoting the degradation of the multiply spliced viral mRNAs. The authors showed that ZAP, through its interaction with DDX17, recruits cellular enzymes to remove the cap structure of the target mRNA and to initiate its degradation by the 5'-3' exoribonuclease Xrn1. These findings may explain the negative effect of DDX17 observed during the late steps of HIV-1 replication. However, the effect of DDX5 remains to be elucidated. The requirement of DDX5 and DDX17 for HIV-1 infectivity also suggests that these proteins fulfill essential function(s) in the late stages of virus replication such as ensuring proper assembly. It is also possible that these proteins are incorporated in HIV-1 virions to facilitate early events in infected cells although they could not be detected in HIV-1 virions (data not shown).

DDX17 is structurally very similar to DDX5 with 90% amino acid identity over the conserved helicase core. However, the N- and C-termini that mediate interactions with proteins or RNAs are significantly different (Janknecht, 2010). The two proteins, acting as homo- or heterodimers, have similar or even redundant cellular functions. However, some functions are specific for each protein (Mooney *et al.*, 2010a). Like DDX5, DDX17 can function through or independently of its helicase activity. In



addition, DDX17 interacts with CBP/p300 as well as with HDAC1 (Shin *et al.* Janknecht, 2007 ; Wilson *et al.*, 2004). DDX17 is subjected to post-translational modifications including sumoylation, acetylation and phosphorylation (Matsuoka *et al.*, 2007 ; Mooney *et al.*, 2010a ; Mooney *et al.*, 2010b). However, compared with DDX5, DDX17 modifications have different consequences with regard to cellular functions (Mooney *et al.*, 2010a).

DDX17 phosphorylation is likely catalyzed by ATM (ataxia telangiectasia mutated) or ATR (ATM and Rad3-related). In fact, DDX17 was identified as a putative ATM/ATR phosphorylation substrate in response to ionizing radiation, a DNA damaging agent (Matsuoka *et al.*, 2007). ATM and ATR kinases are activated in response to double-strand DNA breaks (DSBs) and trigger a cascade of protein phosphorylation leading to DNA repair, cell cycle arrest or apoptosis (Tomita, 2010). Moreover, it was reported that DDX17 protein co-purified with the Ku80 subunit of the DNA-dependent protein kinase (DNA-PK) along with PARP-1 (Sand-Dejmek *et al.*, 2011), Larguet *et al.*, in preparation), two other proteins activated by ATM/ATR phosphorylation in response to DNA damage. The integration of HIV-1 viral DNA in the host cell genome is likely sensed as DNA damage by the cell as it produces proviral DNA intermediate flanked by gaps in the host cell DNA. Activation of the DSB pathway in response to HIV-1 infection has been reported and studies showed that ATM/ATR and DNA-PK as well as Mre11 and NBS1 were involved in post-integration DNA repair (Daniel *et al.*, 2003 ; Daniel *et al.*, 2001 ; Daniel, Katz *et al.* Skalka, 1999 ; Lau *et al.*, 2005 ; Sakurai *et al.*, 2009 ; Smith *et al.*, 2008). Furthermore, it was suggested that DSB repair enzymes may bind to the HIV-1 PIC, regulate the 3'-processing reaction by integrase and protect viral DNA ends (Li *et al.*, 2001 ; Sakurai *et al.*, 2009 ; Smith *et al.*, 2008) . Our results showed that DDX17 interacts with HIV-1 integrase and promotes viral DNA integration. It is possible that DDX17 is phosphorylated by ATM/ATR during HIV-1 infection. It is also possible that DDX17 facilitates HIV-1 integration as a component of the viral PIC where it

interacts with the Ku80 subunit of DNA-PK and probably with other enzymes of the DSB repair pathway.

We found that DDX17 exerts a dual role during HIV infection. This let us speculate that DDX17, in order to promote integration, plays a regulator or sensor role in HIV replication by controlling the levels of Rev protein, known to inhibit integrase activity (Benyamini, Loyter et Friedler, 2011 ; Levin *et al.*, 2010a ; Levin *et al.*, 2010c).

In this study, we showed that DDX5 and DDX17 RNA helicases interact with HIV-1 integrase and facilitate HIV-1 replication in HeLa-CD4 cells by exerting complex functions depending on the step of HIV cell cycle in order to create competent infectious virions. The precise mechanism of their pleiotropic function is not clearly elucidated. However, the data presented highlight that their functions are not simple and clearly demonstrates that HIV select and use to its advantage proteins, like DDX5 and DDX17, that may exert different and opposite functions during its replication cycle to assure the release of competent viruses. This renders more complex and difficult the choice of cellular target proteins to develop antiviral therapies.



### **3.7 Acknowledgements**

We thank Dr. Benoit Barbeau and Dr. Eric Cohen for their help and the access to their P3 laboratories. We thank Dr. Zeger Debyzer and Dr. Lionel Berthoux for their helpful critics and discussion of the manuscript. We are also very grateful for all the materials obtained from Prof. Hans Stahl and Dr. Uhlmann-Schiffler, Dr. Michel J Tremblay and through the NIH AIDS Research and Reference Reagent Program, Division of AIDS, NIAID, NIH. This work was supported by a NSERC grant to EE and ER.

### 3.8 Figure legends

**Figure 3.1. DDX5 and DDX17 specifically interact with HIV-1 integrase.** (A) Endogenous DDX5 and (B) FLAG-tagged DDX17 co-immunoprecipitate with HIV-1 integrase. Cell extracts from 293T-IN<sup>s</sup>ala (stably expressing HIV-1 IN, +) or 293T cells (negative control, -), transfected or not with FLAG-DDX17 expressing plasmid, were subjected to immunoprecipitation (IP) by using anti-IN polyclonal antibodies. Immunoblots were then probed with anti-DDX5 ( $\alpha$ -DDX5), anti-FLAG ( $\alpha$ -FLAG) and anti-IN ( $\alpha$ -IN) monoclonal antibodies, respectively. (C) and (D) Pull-down assays demonstrating direct interaction of DDX5 and DDX17, respectively, with HIV-1 integrase. Purified integrase was incubated with purified His-tagged DDX5, DDX17 or with Ni-NTA beads alone (negative control). Proteins bound to beads were analyzed by western blotting (WB) using anti-PentaHis ( $\alpha$ -His) or anti-IN ( $\alpha$ -IN) monoclonal antibodies.

**Figure 3.2. DDX5 and DDX17 knockdown inhibits HIV-1 replication.** (A) HeLa-CD4-LTR- $\beta$ -gal cells were transfected with siRNAs targeting DDX5 (filled triangles), DDX17 (filled circles) or with control siRNA (empty squares). Cells were subsequently infected with HIV-1 virions and supernatants were harvested at different time points post infection. HIV-1 replication was measured as p24 production by ELISA. (B) and (C) Reduction of DDX5 and DDX17 mRNA expression following siRNA treatment. HeLa-CD4-LTR- $\beta$ -gal cells were transfected with specific siRNAs (siDDX5, siDDX17) or control siRNA. Cells were collected at the indicated time points. RNA was isolated and analyzed by qRT-PCR. (E) and (F) Cell viability was determined at 1, 2 and 3 days after siRNA transfection using the MTS/PMS assay. Data are expressed as percentage of those obtained with cells transfected with control siRNA. Results shown are the means  $\pm$  SD of three parallel experiments.

**Figure 3.3. DDX5 and DDX17 overexpression increases HIV-1 replication.** (A) HeLa-CD4-LTR- $\beta$ -gal cells were transfected with vectors expressing FLAG-DDX5 ,

FLAG-DDX17 or with the empty vector. The cells were then infected with HIV-1 virions and supernatants assayed for p24 production on day 6 post infection. Means  $\pm$  SD for three parallel infections are shown. \*,  $P < 0.05$ . (B) Western blot showing FLAG-DDX5 and FLAG-DDX17/p72 expression levels.

**Figure 3.4. Effects of transient knockdown of DDX5 on HIV-1 DNA species levels.** HeLa-CD4-LTR- $\beta$ -gal cells were transfected with DDX5 specific siRNA (siDDX5) or control siRNA and infected with HIV-1 virions 48 hours later. At different time points post infection, the cells were harvested, and DNA was extracted. (A) Total viral cDNA (B) late RT transcripts (C) 2-LTR circles and (D) Integrated viral DNA were quantified by qPCR as described in Materials and Methods. Results are expressed as percentage of the control. The results represent the means  $\pm$  SD of three experiments. \*,  $P < 0.05$ , \*\*,  $P < 0.01$ .

**Figure 3.5. Effects of transient knockdown of DDX17 on HIV-1 DNA species levels.** Same as in FIG. 4 except that HeLa-CD4-LTR- $\beta$ -gal cells were transfected with DDX17 specific siRNA (siDDX17) instead of DDX5 specific siRNA. \*,  $P < 0.05$ , \*\*,  $P < 0.01$ , \*\*\*,  $P < 0.001$ , \*\*\*\*,  $P < 0.0001$ .

**Figure 3.6. Effects of transient knockdown of DDX5 or DDX17 in target cells on HIV-1 replication.** HeLa-CD4-LTR- $\beta$ -gal cells were transfected with DDX5, DDX17 specific siRNAs or control siRNA and infected with HIV-Luc virions 48 hours later. (A) Integrated and (B) total viral DNA were determined at 48h post infection by qPCR. (C) Viral expression was determined by Luciferase activity in cell lysates at 48h post infection. The results represent the means  $\pm$  SD of three experiments.  $P < 0.01$ , \*\*\*,  $P < 0.001$ .

**Figure 3.7. Effects of transient knockdown of DDX5 or DDX17 in target cells on post-integration steps.** (A) in HeLa-CD4-LTR- $\beta$ -gal cells. (B) and (C) in 293T cells. Cells were transfected with DDX5, DDX17 specific siRNAs or control siRNA and

co-transfected 48 hours later with the HIV-1 NL4-3.Luc.R-E- and VSV-G expression plasmids. Viral expression was determined by Luciferase activity in cell lysates at 24h post transfection. Viral particle production measured as p24 release by 293T cells was measured 48h after the transfection of the viral vector. The results  $\pm$  SD of three experiments are shown. \*,  $P<0.05$ , \*\*,  $P<0.01$ .

**Figure 3.8. Down regulation of DDX5 or DDX17 proteins in HIV-1 producer cells reduces virion infectivity.** (A) 293T cells were treated with siRNAs (siDDX5, siDDX17 or siControl) then co-transfected with HIV-1 pNL4-3.Luc.R-E- and VSV-G expression plasmids. The supernatants were harvested 48 hours after the plasmid transfection and assayed for p24 content by ELISA. Equal amounts of virions produced from siRNAs treated cells were used to infect HeLa-CD4-LTR- $\beta$ -gal cells and Luciferase activity was measured at 48h post infection. (B) HeLa-CD4-LTR- $\beta$ -gal cells were treated with siRNAs then infected with HIV-1 virions. On day 3 post infection, the supernatants were normalized for p24 content and used to infect LuSIV indicator cells. The cells were lysed 48 h after the infection and Luciferase activity was measured. Luciferase activity was normalized to the protein content and the infectivity was calculated as a percentage of the control. The results are means  $\pm$  SD of triplicate analysis. \*,  $P<0.05$ , \*\*,  $P<0.01$ .

Figure 3.1

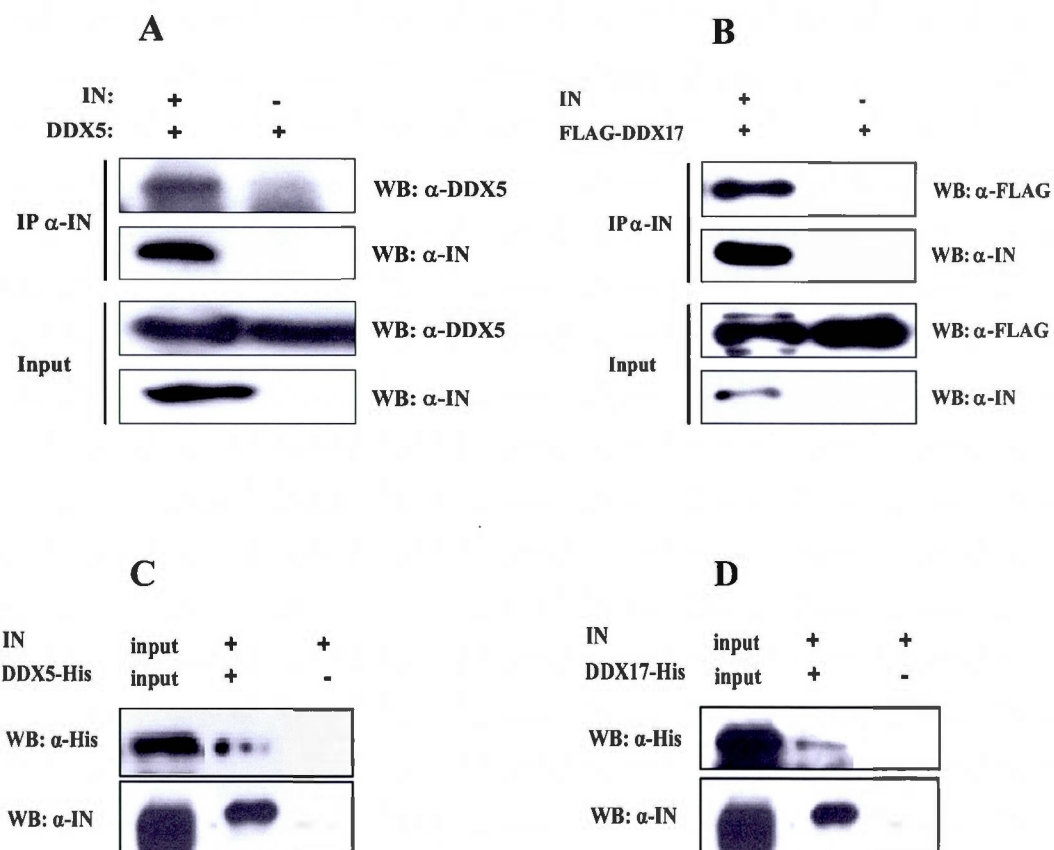


Figure 3.2

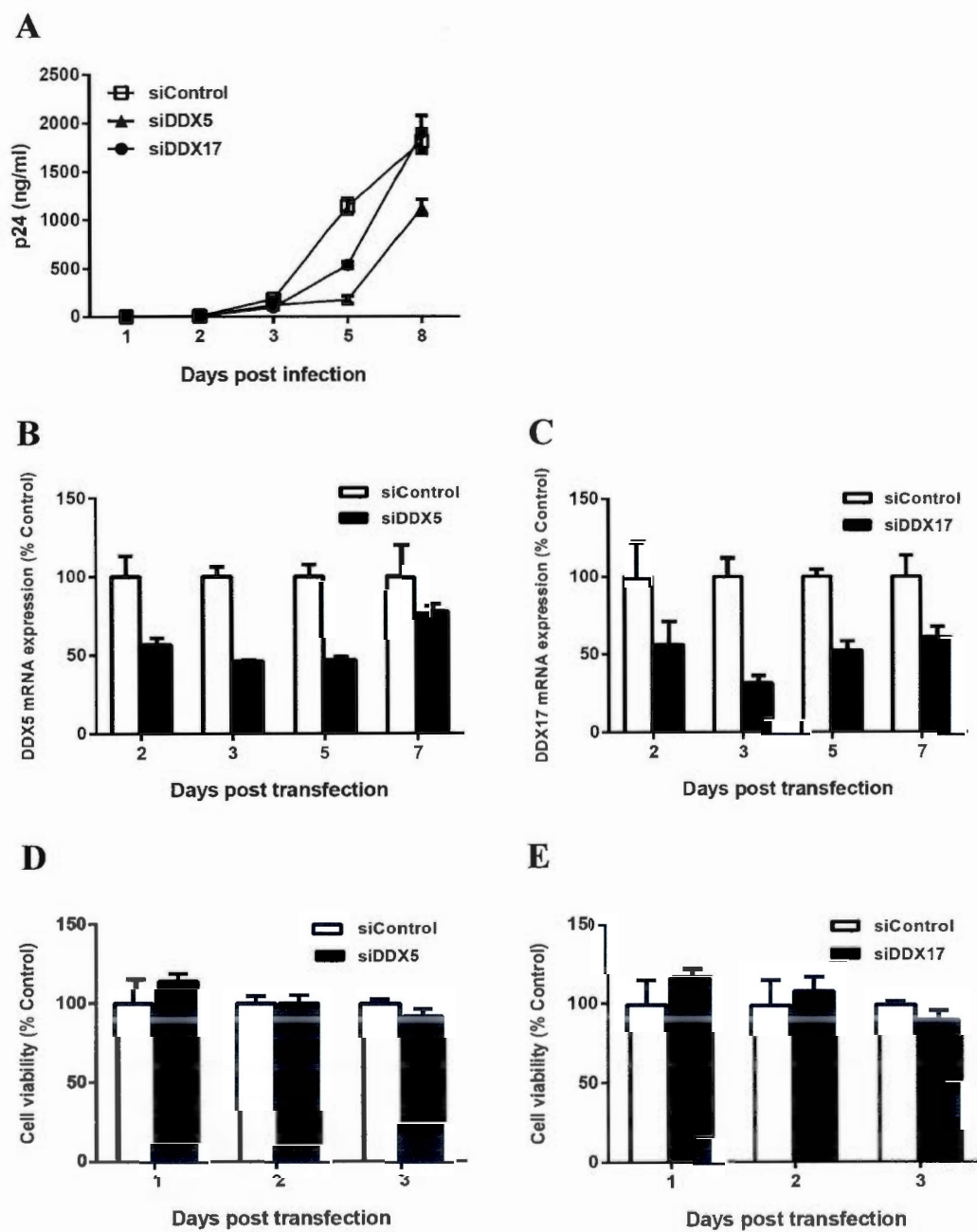
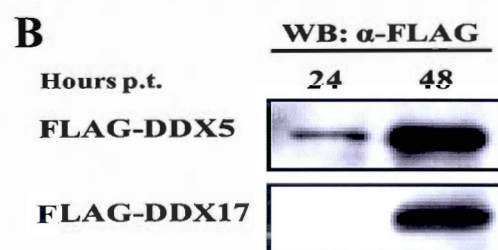
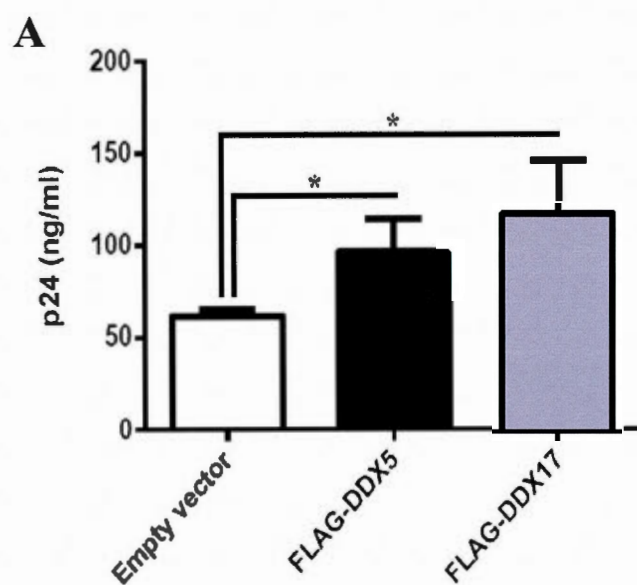




Figure 3.3



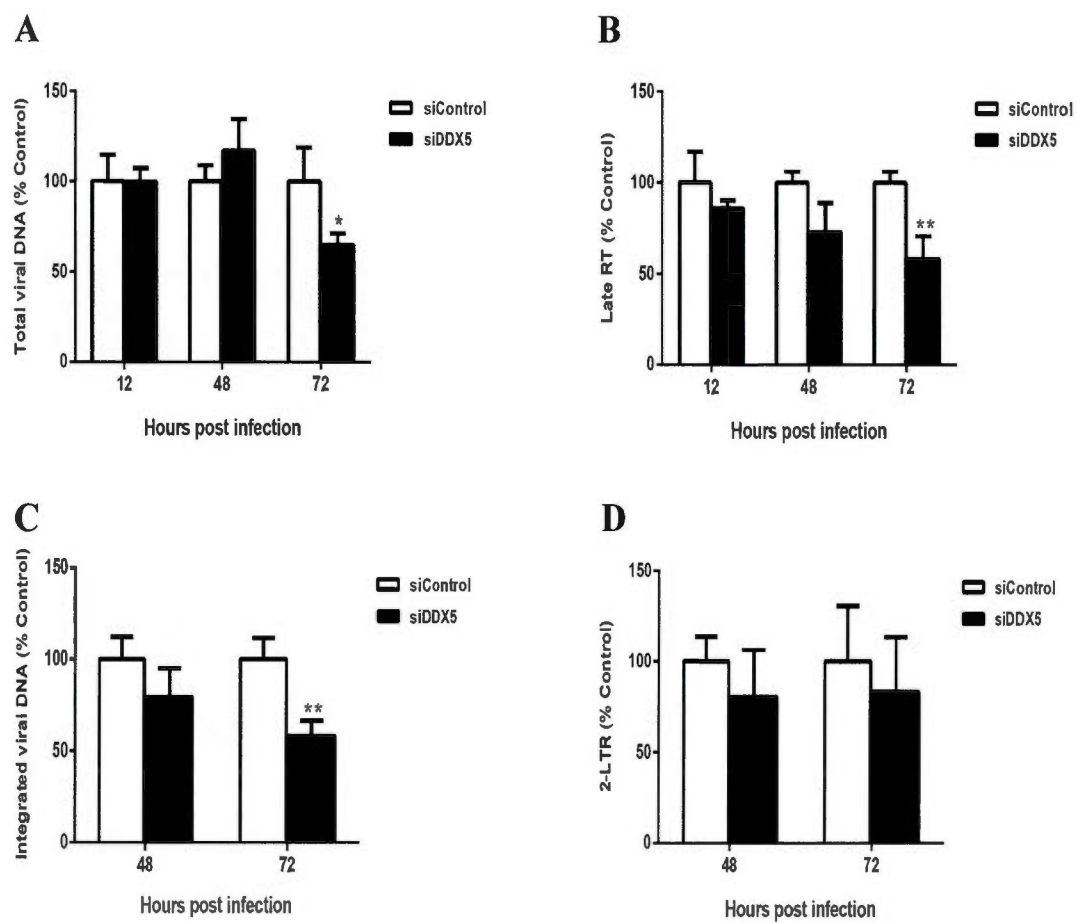
**Figure 3.4**

Figure 3.5

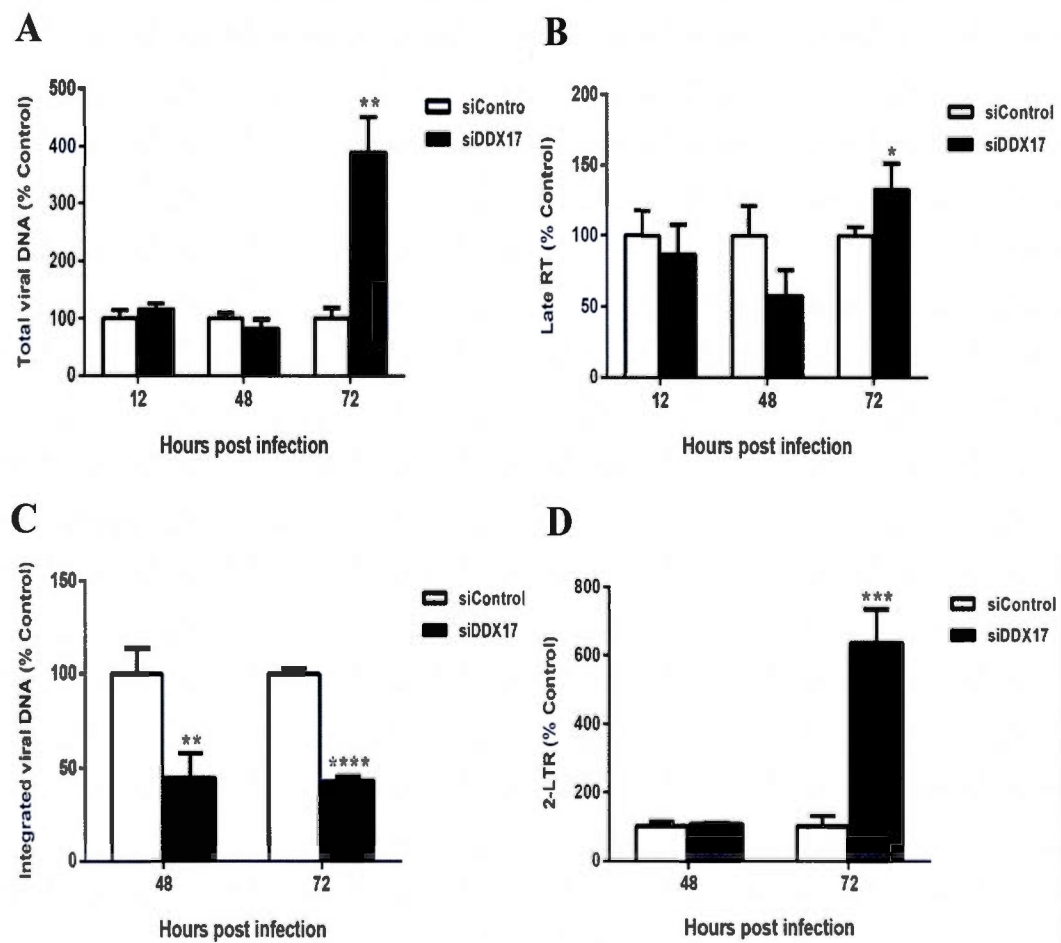


Figure 3.6

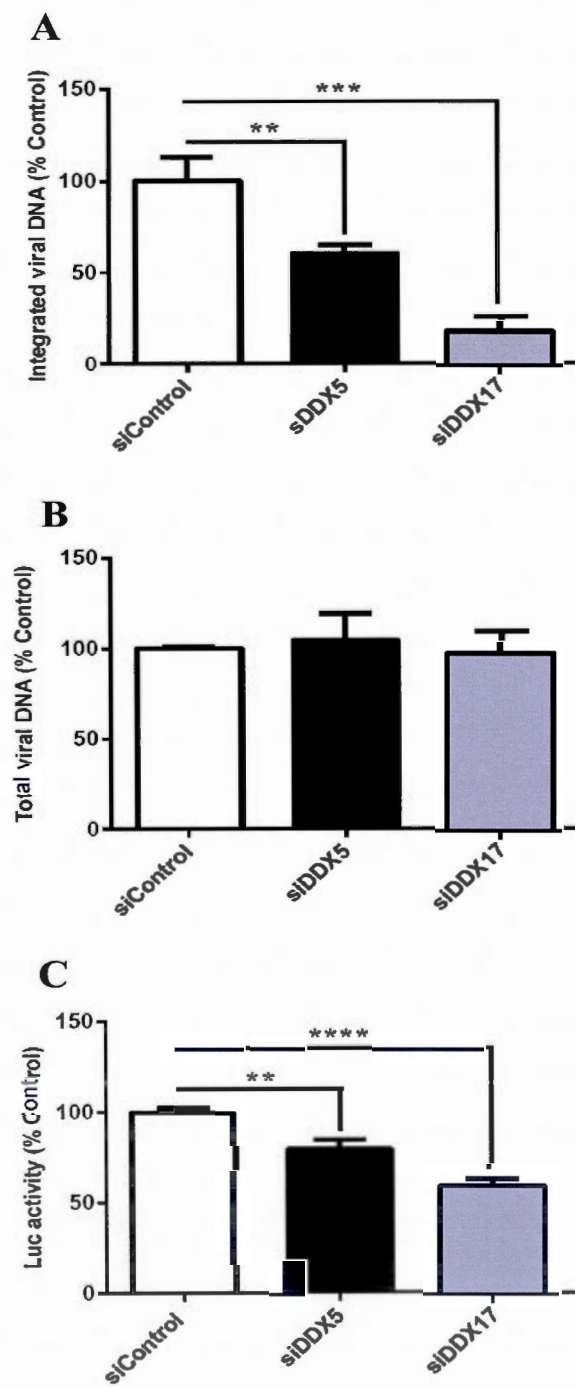


Figure 3.7

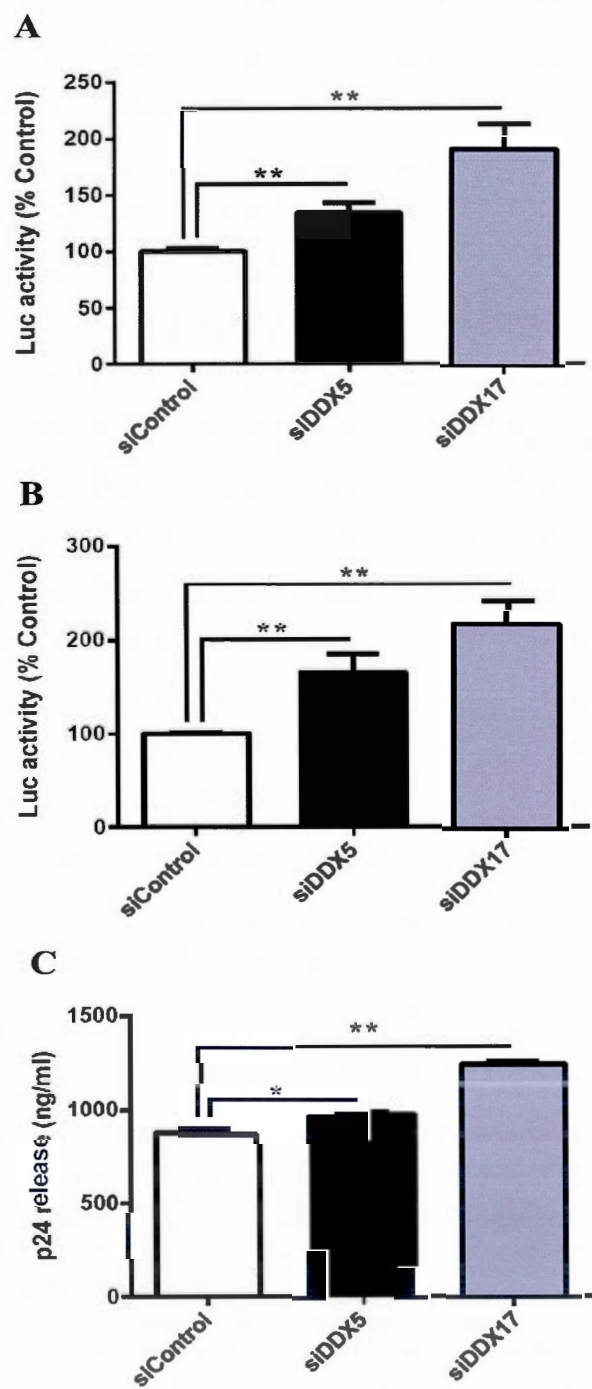
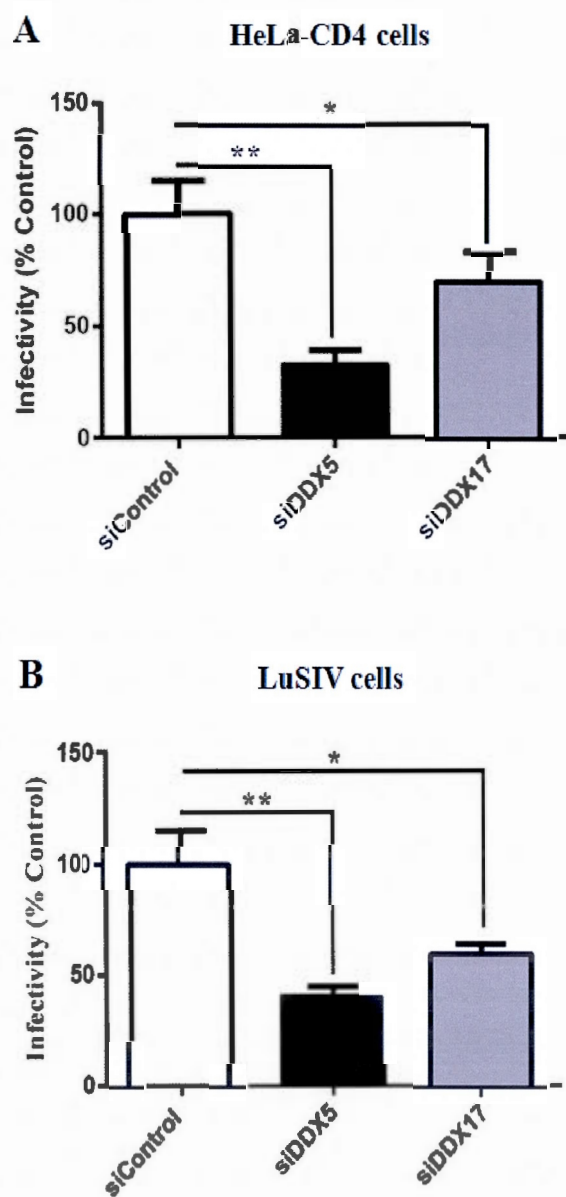


Figure 3.8





## **CHAPITRE IV**

### **HDAC1 histone deacetylase interacts with HIV-1 integrase and modulates virus replication**

**Fadila Larguet, Benoît Barbeau, Eric Rassart and Elsy Edouard**

**2012**

**Soumis à Journal of General Virology**

## Avant-propos

Comme nous l'avons déjà mentionné dans le chapitre II, l'histone désacetylase 1 (HDAC1) figurait parmi les protéines co-purifiées avec l'intégrase du VIH-1 dans le crible que nous avons réalisé.

Dans le présent chapitre, nous nous sommes intéressés à étudier le rôle que joue cette protéine dans le cycle de réplication du VIH-1. Le lien de HDAC1 avec l'intégrase a récemment été décrit dans des travaux concomitants au nôtre (Allouch *et al.*, 2011 ; Sorin *et al.*, 2009). De notre part, nous avons confirmé l'interaction des deux protéines et avons montré que HDAC1 facilite la réplication du VIH-1 dans les cellules HeLa. Il reste cependant à évaluer le rôle de HDAC1 dans les cellules T CD4+ primaires vus les résultats des études démontrant le rôle des protéines HDACs, en particulier les membres de la classe I dont fait partie HDAC1, dans la répression de l'expression du VIH-1 dans les cellules CD4+ infectées et latentes (Archin *et al.*, 2009 ; Coull *et al.*, 2000 ; Imai et Okamoto, 2006 ; Jiang *et al.*, 2007 ; Keedy *et al.*, 2009 ; Marban *et al.*, 2007 ; Tyagi et Karn, 2007 ; Williams *et al.*, 2006; Ylisastigui *et al.*, 2004)

Au cours de ce travail, . Edouard E. a réalisé les expériences du pull-down. J'ai moi-même conçu et réalisé le reste des travaux et rédigé le manuscrit. Edouard E. Barbeau B. et Rassart E. ont corrigé le manuscrit.

#### 4.1 Résumé

Le développement de nouvelles stratégies thérapeutiques est une priorité majeure de la recherche, en raison de l'apparition de la résistance aux traitements antiviraux actuels. Une stratégie antivirale en plein essor repose sur l'inhibition des interactions clés entre le virus et la cellule hôte. L'intégration de l'ADNc viral, issu de la transcription inverse, dans le chromosome de la cellule est une étape essentielle dans le cycle de vie du VIH-1. L'intégration est catalysée par l'intégrase (IN) virale présente dans le virion. Pour assurer une intégration efficace dans les cellules infectées, l'intégrase est assistée par de nombreux facteurs cellulaires qui représentent des cibles prometteuses pour une thérapie antivirale. Dans le présent travail, nous rapportons l'interaction de HDAC1 avec l'intégrase du VIH-1. A l'aide de l'inhibition de son expression protéique par siRNA ou de sa surexpression, nous démontrons que HDAC1 facilite la réplication du VIH-1. Nous trouvons que HDAC1 n'intervient pas dans les étapes qui suivent l'intégration mais favorise plutôt une étape précoce dans le cycle de réplication, probablement au niveau de la transcription inverse. Nous démontrons aussi que HDAC1 est nécessaire à l'infection des cellules Jurkat mais non dans les cellules HeLa.

Mots-clés: HIV-1, intégrase, cofacteurs, histone désacetylase 1, transcription inverse

## 4.2 Abstract

Development of novel therapeutic targets against HIV-1 is a high research priority due to acquisition of resistance to current antiretroviral drugs. A rising strategy against HIV-1 infection is to target key virus-cell interactions. The integration of reverse transcribed viral cDNA into a host chromosome is one of the essential steps in the HIV-1 life cycle. It is catalyzed by the viral integrase (IN) present in the virion. To achieve an efficient integration in infected cells, HIV-1 IN is assisted by several host factors that could constitute promising new targets for antiviral therapy. In this study, we report the interaction of HIV-1 integrase with HDAC1. Through RNA silencing and overexpression experiments, we demonstrate that HDAC1 facilitates HIV-1 replication. We find that HDAC1 does not affect post-integration events but instead promotes an early pre-integration step in the HIV-1 replication cycle, possibly involving reverse transcription. We also show that HDAC1 is required for infection of Jurkat cells but not HeLa cells. Altogether, our results show that HDAC1 plays a positive role in HIV-1 replication.

**Keywords:** HIV-1, integrase, cofactors, histone deacetylase 1, reverse transcription

### 4.3 Introduction

Following virus entry into the target cell, the human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) genome RNA is retro-transcribed in blunt-ended double-stranded linear DNA, which is integrated in the host chromosome. Integration is one of the essential steps in the HIV-1 life cycle and is catalyzed by the viral integrase (IN) present in the virion. Moreover, studies have suggested that HIV-1 IN has additional functions in viral replication such as uncoating, reverse transcription, nuclear import of viral cDNA and virion maturation (Briones, Dobard et Chow, 2010 ; Hehl *et al.*, 2004 ; Ikeda *et al.*, 2004 ; Jayappa *et al.*, 2011 ; Mohammed, Topper et Muesing, 2011 ; Wilkinson *et al.*, 2009 ; Zhu, Dobard et Chow, 2004). The integration reaction proceeds in three steps. The first step, also known as 3'-processing, takes place in the cytoplasm and leads to the removal of the dinucleotide (GT) from each 3' end of the viral long terminal repeat (LTR) adjacent to a conserved CA dinucleotide, thereby generating two CA'-3-hydroxyl DNA ends. In the strand transfer step, which occurs in the nucleus, CA-3'-hydroxyl DNA ends are covalently joined to 5'-phosphates in the host DNA to produce the integration intermediate. At the final step, the integration is completed by gap filling of unrepaired 5'-ends of the viral DNA by cellular enzymes. Purified IN exhibits both 3'-processing and strand transfer *in vitro*. However, reactions with recombinant integrase mainly result in the insertion of a single viral DNA end in a single strand of the duplex target DNA (Bushman et Craigie, 1991 ; Craigie, Fujiwara et Bushman, 1990).

In infected cells, IN functions in the context of the preintegration complex (PIC), a large nucleoprotein complex formed in the cytoplasm with components derived from the core of the infecting virion (viral cDNA, matrix, nucleocapsid, reverse transcriptase, VPR protein, and IN) and cellular factors. A variety of cellular proteins were identified as important partners needed for a successful integration of viral DNA in infected cells. The cellular IN cofactors were identified in different

ways: (i) *in vitro* reconstitution of enzymatic activity of salt-stripped PICs (ii) the yeast two-hybrid assay and (iii) co-immunoprecipitation and pull-down assays. Several proteins identified using these approaches were shown to physically interact with IN and to affect HIV-1 replication in cell culture experiments (Vandegraaff et Engelman, 2007). The identification and characterization of new IN cellular cofactors will increase our understanding of the viral integration and potentially lead to the development of new antiviral drugs.

In order to identify new HIV-1 IN-interacting cellular proteins, we recently developed an *in vitro* purification protocol using streptavidin-coupled magnetic beads and a portion of U3-LTR as bait for separation followed by mass spectrometry (Larguet *et al.* in preparation). This approach led to the isolation of known integration cofactors in addition to new cellular IN candidates, which also included histone deacetylase1 (HDAC1).

HDAC1 belongs to the histone deacetylase family (HDACs) that is subdivided into four distinct groups, known as class I, class II, class III and class IV. Class I HDACs include HDAC1, 2, 3 and 8 (Bolden, Peart et Johnstone, 2006). Histone deacetylase(s) (HDACs) regulate transcription by acetylating the  $\gamma$ -amino groups of lysine residues at histone tails. Generally, histone deacetylation is associated with an inactive heterochromatin where the accessibility of the nucleosomal DNA toward transcription factors is limited (Yang et Seto, 2007). Many studies have been devoted to elucidate the role of HDAC proteins in HIV-1 silencing in latently infected cells. Reports showed that HDAC1, HDAC2 and HDAC3 associate with the integrated HIV-1 LTR and repress viral transcription (Coull *et al.*, 2000 ; Imai et Okamoto, 2006 ; Jiang *et al.*, 2007 ; Marban *et al.*, 2007 ; Tyagi et Karn, 2007 ; Williams *et al.*, 2006). Furthermore, HDAC inhibitors were shown to induce viral expression in latently infected cell lines and in resting CD4<sup>+</sup> T cells obtained from aviremic HIV-1 positive patients (Archin *et al.*, 2009 ; Ylisastigui *et al.*, 2004). Few studies have



examined the role of HDAC1 in HIV-1 replication at steps other than the regulation of the proviral expression.

In this report, we show that HDAC1 does interact with the HIV-1 integrase. We demonstrate that it positively modulates HIV-1 replication and is involved in a pre-integration step in the HIV-1 replication cycle. We also show that HDAC1 is required for virion infectivity in Jurkat cells but not in HeLa cells. Altogether, our results highlight a positive role for HDAC1 in HIV-1 replication.

## 4.4 Results

Using a U3-LTR biotinylated fragment as DNA bait in a streptavidin magnetic bead separation coupled with mass spectrometry, we co-purified HIV IN with known cofactors as well as several cellular proteins with a potential as integrase partners (Larguet *et al.*, in preparation). Among the new IN cofactor candidates HDAC1 was identified. Therefore, we decided to further investigate its interaction with integrase and characterize its role in HIV replication.

### 4.4.1 HDAC1 specifically interacts with HIV-1 integrase

We first investigated the interaction of HDAC1 with HIV-1 IN by co-immunoprecipitation. Lysates from 293T-IN<sup>s</sup>ala cells (stably expressing HIV-1 IN) or 293T cells (negative control) were transfected with the FLAG-HDAC1 expression vector and subjected to immunoprecipitation using anti-IN antibodies or normal rabbit IgG as negative control. Immunoprecipitates were analyzed with anti-FLAG and anti IN antibodies. As shown in Figure. 4.1A, FLAG-HDAC1 was present in immunoprecipitates from transfected 293T-IN<sup>s</sup>ala lysates unlike those from 293T, indicating that this protein could specifically interact with HIV-1 IN. To confirm this interaction, we carried out a pull-down assay using purified IN and His-tagged HDAC1. In this assay, IN was detected following pull-down demonstrating a direct interaction between IN and His-HDAC1 (Fig 4.1B).

### 4.4.2 Transient knockdown of HDAC1 inhibits HIV-1 replication

To study the impact of HDAC1 on HIV-1 replication, HDAC1-specific siRNAs were tested in HeLa-CD4 cells in the context of multiple rounds of infection. HeLa-CD4 cells were transfected with the HDAC1 siRNA (siHDAC1) or with a non-related control siRNA (siControl). Cells were next infected with HIV-1 NL4.3 and infection monitored for 8 days. HIV-1 replication was measured by quantification of the p24 viral protein in cell supernatants at day 1, 2, 3, 5 and 8 postinfection (pi). The

results show a significant inhibition of HIV-1 replication in cells silenced for HDAC1 expression compared to the control cells (Fig. 4.2A). The effect was particularly prominent on day 5 pi where HDAC1 knockdown led to a 4.5-fold inhibition of HIV-1 replication compared to control. Subsequently, the inhibition became less important likely due to reduced silencing.

In parallel, the efficiency of transfected siRNAs was determined. As assessed through real-time PCR, a significant and steady reduction (70-77%) of HDAC1 mRNA expression levels was observed up to day 7 post-transfection (day 5 pi) with a maximum knockdown at day 2 (Fig. 4.2B). Cell viability was also monitored for three days after siRNA transfection and no cytotoxic effects were noticed (Fig. 4.2C). Similar inhibition of HIV-1 replication was obtained using a different HDAC1 specific siRNA (data not shown), ruling out non specific or off-target effects of siRNAs. Overall, our results thereby indicate a positive role of HDAC1 on HIV-1 replication.

To further demonstrate the specific impact of HDAC1 on HIV-1 replication, we tested its overexpression. For this purpose, HeLa-CD4 cells were transfected with p-FLAG-HDAC1 or with the empty vector (mock) and infected with HIV-1 48h later. As shown in Figure 4.3A, overexpression of HDAC1 in HeLa-CD4 cells induced an increase although not significant in virus production compared to mock-transfected cells. Overexpression of HDAC1 in transfected cells was confirmed by Western blot analysis (Fig. 4.3B). These results and those obtained by transient knockdown suggest that HDAC1 facilitates HIV-1 replication.

#### **4.4.3 HDAC1 knockdown affects HIV replication before integration**

Since we demonstrated that HDAC1 interacts with the HIV-1 integrase, we next investigated its impact on viral DNA integration and thereby quantified the viral DNA species (total viral cDNA, late RT, 2-LTR circles and integrated DNAs) at 12,

48 and 72h pi in siHDAC1-transfected HeLa-CD4 cells (Fig. 4.4). Levels of total viral DNA were first noted to be comparable in HDAC1-knockdown cells and control cells, indicating that HDAC1 siRNA treatment did not affect virus entry or steps before viral cDNA synthesis (Fig. 4.4A). In contrast, levels of the late RT species significantly decreased in the HDAC1-knockdown cells demonstrating a 25 and 50% reduction at 48h and 72h pi, respectively (Fig. 4.4B). HDAC1 siRNA displayed no effect on the level of integrated DNA at 48h pi. However, HDAC1 knockdown reduced integrated DNA levels by over 40% at 72 h pi (Fig. 4.4C). The decrease in integrated DNA levels measured at 72h pi is likely the result of decreased late RT levels and not the result of a default of PIC nuclear import since 2-LTR circle levels were not significantly different between siHDAC1 and siControl treated cells (Fig. 4.4D). Our results therefore suggest that the replication of HIV-1 in HDAC1-knockdown cells is affected before nuclear import and integration and probably at the late reverse transcription step.

#### **4.4.4 Transient knockdown of HDAC1 in HIV-1 target cells reduces late RT levels**

In the above experiments, we used a replication-competent virus and two cycles of infection have likely occurred within the 72 hours time period of infection, the second cycle resulting from infection by HIV particles produced from the initially infected cells. Furthermore, as partial knockdown of HDAC1 was maintained during this period (as shown in Fig. 4.2A), results obtained in siHDAC1-transfected cells could depend on an effect of siRNAs on both producer and target cells. To distinguish between these two possibilities, experiments were carried out with a VSV-G pseudotyped HIV-Luc reporter virus, which is capable of a single round infection. HeLa-CD4 cells were first transfected with either siHDAC1 or siControl and then infected with HIV-Luc virions. The results show that late RT levels, measured at 24h pi, exhibited a 40% reduction in siHDAC1-transfected cells compared to control (Fig.

4.5A). Moreover, integrated viral DNA levels measured on day 6 pi (to avoid contamination with nonintegrated viral DNA) showed a more pronounced reduction in siHDAC1-transfected cells compared to control cells (Fig. 4.5B). Similarly, a significant difference in luciferase activity was detected between siHDAC1 and siControl-transfected cells (Fig. 4.5C). These data are consistent with those obtained in multiple-round infection experiments and indicate that HDAC1 silencing in HIV-1-infected cells leads to a reduction of late RT species and consequently a reduction of integrated viral DNA levels and viral protein expression.

We also analyzed the effect of HDAC1 silencing on post-integration steps of HIV-1 replication. For this purpose, HeLa-CD4 cells were transfected with siHDAC1 or siControl and further transfected 48h later with pNL4-3.Luc.R-E- and a VSV-G expression vector to by-pass the integration step. Luciferase activity measured at 48h pi showed no significant differences between siHDAC1- and siControl -transfected cells (Fig. 4.6A). The same transfection experiments in 293T cells showed that both luciferase activity and p24 release were not different between siHDAC1- and siControl-transfected cells (Fig. 4.6B-C). These results thereby confirm that, under these experimental conditions, HDAC1 is not involved in post-integration steps of HIV-1 replication.

#### **4.4.5 Transient knockdown of HDAC1 in HIV-1 producer cells impacts differently the replication in infected cell lines**

We subsequently examined the effect of HDAC1 silencing in HIV-1 producer cells on virion infectivity. 293T cells were treated with siHDAC1 or siControl, then co-transfected with the pNL4-3.Luc.R-E- clone and a VSV-G expression vector. Culture supernatants were normalized for p24 content and used to infect HeLa-CD4 cells and Jurkat cells. Virion infectivity, as assessed by luciferase activity, was not changed with siHDAC1 treatment compared to the control in HeLa-CD4 cells (Fig. 4.7A). In contrast, a significant decrease of infectivity was observed after siHDAC1

treatment compared to the control in Jurkat cells (Fig. 4.7B). Our results suggest that requirement of HDAC1 for HIV-1 virion infectivity depends on the target cells.



## 4.5 Discussion

Our results show that HDAC1 interacts with HIV-1 integrase and promotes HIV-1 replication. This effect was evidenced by siRNA-mediated knockdown. Furthermore, we observed a tendency of increase in virus replication when the protein was overexpressed. Our results also indicate that HDAC1 is involved in an early event of the HIV-1 life cycle before integration, likely at the reverse transcription step. Indeed, HDAC1 knockdown in HIV-1-infected cells decreased the late reverse transcripts levels early in infection. However, HDAC1 silencing does not appear to affect post-integration events when the integration step is bypassed by direct transfection of proviral DNA constructs both in HeLa-CD4 and 293T cells. We also showed that HDAC1 knockdown in HIV-1-producing cells reduced infectivity of virions when they infect Jurkat T-cells but not HeLa-CD4 cells, suggesting that the requirement of HDAC1 for HIV-1 infectivity depends on the cellular context. The low levels of HDAC2 expression in Jurkat cells (Hassig *et al.*, 1998) may explain the difference in infectivity and further suggest that HDAC1 and HDAC2 act as a heterodimer. Sorin and co-workers (Sorin *et al.*, 2009) have reported that siRNA-mediated silencing of HDAC1 or the expression of a dominant negative mutant (HDAC1<sup>H141A</sup>) in HIV-1-producing cells led to a decrease in the produced virion infectivity in an osteosarcoma cell line. Furthermore, the authors showed that the impairment of infectivity resulted from a defect in early reverse transcription. The authors also showed that HDAC1 was incorporated in HIV-1 virions in an integrase-dependent manner as part of the Sin3a-HDAC1 complex. However, in a recent report, Allouch *et al.* (Allouch *et al.*, 2011) showed that HDAC1 knockdown increased HIV-1 integration. The authors proposed that HDAC1 is recruited by KAP1, a protein belonging to the antiviral TRIM family, to deacetylate HIV-1 integrase leading to a decrease in viral integration. Acetylation of the integrase carboxy-terminal domain (CTD) by p300 and GCN5 histone acetyl transferases has been well demonstrated (Cereseto *et al.*, 2005 ; Terreni *et al.*, 2010 ; Topper *et al.*, 2007). However, the

requirement of this modification for integrase function and virus replication is still questioned (Topper *et al.*, 2007). Indeed, mutational analysis of integrase lys residues (K264, K266, K273), commonly acetylated by p300 and GCN5, revealed that K273R and K273A mutant viruses behave similarly to the wild type version (Lu, Ghory et Engelman, 2005 ; Topper *et al.*, 2007). Likewise, K264R as well as K264A and K266R mutations had no significant effects on virus replication. Only the K266A and K→E (on AA 264, 266, or 273) mutations resulted in replication-defective viruses (Lu, Ghory et Engelman, 2005 ; Topper *et al.*, 2007) probably due more to a loss of a positive charge or the presence of a negative charge at these positions rather than the absence of acetylation. It thus appears that the loss of the acetylation potential of HIV-1 integrase does not impair virus replication.

Several studies have demonstrated that HIV-1 integrase interacts with reverse transcriptase and that integrase mutations affect reverse transcription (Dobard, Briones et Chow, 2007 ; Engelman *et al.*, 1995 ; Hehl *et al.*, 2004 ; Wilkinson *et al.*, 2009 ; Wu *et al.*, 1999 ; Zhu, Dobard et Chow, 2004). Interestingly, two proteins, the integrase interactor protein 1 (INI1) and Gemin2, have been reported to interact with HIV-1 integrase and to affect reverse transcription efficiency (Hamamoto *et al.*, 2006 ; Maroun *et al.*, 2006 ; Nishitsuji *et al.*, 2009 ; Turelli *et al.*, 2001) and this may be the case for HDAC1. Deacetylase activity appears to be required for this effect since a functionally inactive mutant (HDAC1<sup>H141A</sup>) was shown to reduce RT reaction INI1 (Sorin *et al.*, 2009). In addition to histones, HDACs can modify a variety of non-histone proteins and regulate many diverse functions, including protein-protein and protein-DNA interactions, enzyme activity, protein stability, and subcellular localization (Arif, Selvi et Kundu, 2010 ; Batta *et al.*, 2007). Among HDAC1 substrates are p53 and p21<sup>WAF1/Cip1</sup> (Juan *et al.*, 2000 ; Li *et al.*, 2010). Bergamaschi *et al.* (Bergamaschi *et al.*, 2009) have reported that p21 restricts HIV-1 replication in macrophages. Interestingly, the authors found that the HDAC inhibitor, MS-275, led to p21 induction and inhibition of HIV-1 replication and that such inhibition was

associated with a decrease in the reverse transcription levels. Furthermore, Li et al. (Li *et al.*, 2010) have demonstrated that HDAC1 siRNA as well as TSA (HDAC inhibitor) treatments led to p21 induction in HeLa cells. The authors reported that HDAC1 binds directly to p21 and prevents its acetylation, thereby enhancing its degradation *via* the 20S proteasome pathway. Thus, we can speculate that HIV-1 integrase recruits HDAC1 to p21 causing its deacetylation and consequently its degradation and this would be a way for the virus to overcome the restriction caused by p21.

Several lines of evidence suggest that HDAC proteins, through deacetylation of histones, are involved in regulating HIV-1 proviral expression. Indeed, HDAC inhibitors can induce viral expression in latently-infected cell line models and in resting CD4+ T cells obtained from aviremic HIV-1 positive patients (Archin *et al.*, 2009 ; Ylisastigui *et al.*, 2004). Furthermore, it was demonstrated that HDAC proteins including HDAC1, HDAC2 and HDAC3 are recruited to the HIV-1 LTR in latently-infected cell lines (Coull *et al.*, 2000 ; Imai et Okamoto, 2006 ; Jiang *et al.*, 2007 ; Marban *et al.*, 2007 ; Tyagi et Karn, 2007 ; Williams *et al.*, 2006). However, using siRNA, only HDAC2 and HDAC3 were shown to regulate LTR-driven expression (Keedy *et al.*, 2009). Consistent with these findings, our results showed that HDAC1 siRNA in HeLa or 293T cells did not affect LTR-driven expression of luciferase or virion production upon transfection of proviral DNA constructs. Sorin et al. (Sorin *et al.*, 2009) also reported that siRNA knockdown of HDAC1 in 293T cells did not affect HIV-1 particle production. On the other hand, these authors showed that the expression of a dominant negative mutant of HDAC1 (HDAC1<sup>H141A</sup>) increased virion production. It has already been reported that HDAC1 and HDAC2 can function as homo- or heterodimers and that the HDAC1<sup>H141A</sup> mutant inhibits the activity of both proteins (Luo *et al.*, 2009). Thus, the findings reported by Sorin and co-workers may indicate that HDAC2 but not HDAC1 regulates the expression of HIV-1, which is consistent with our results.

HDAC inhibitors are under investigation as part of a new strategy based on reactivating HIV-1 expression in latently-infected cells in association with highly active therapies to eliminate HIV-1 latent reservoirs (Colin et Van Lint, 2009). Based on our results indicating that HDAC1 plays a positive role in HIV-1 replication, we believe that HDAC inhibitors would have a dual benefit to purge HIV-1 reservoirs: they could induce the expression of latent proviruses and also inhibit the replication of newly synthesized viruses.

## 4.6 Methods

### 4.6.1 Cells

Human embryonic kidney 293T cells (ATCC) were cultured in Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) containing 10% fetal bovine serum (FBS), 2 mM L-glutamine, 50 U/ml penicillin and 50 µg/ml streptomycin (DMEM-complete). 293T-IN<sup>s</sup>ala cells, stably expressing high levels of HIV-1 integrase, were obtained from Dr. Zeger Debyser (Cherepanov *et al.*, 2000) and grown in DMEM-complete supplemented with 200 µg/ml hygromycin B. HeLa-CD4-LTR-β-gal (HeLa-CD4) cells were obtained from Dr. Michael Emerman (Kimpton et Emerman, 1992) through the NIH AIDS Research & Reference Reagent Program and were maintained in DMEM supplemented with 10% FBS, 200 µg/ml G418 and 100 µg/ml hygromycin B. Jurkat T cells, cells were cultured in RPMI medium containing 10% FBS and 2 mM L-glutamine and antibiotics.

### 4.6.2 Plasmids

The FLAG-HDAC1 expression plasmid was constructed as follows. The cDNA coding sequence of human HDAC1 flanked by EcoRI restriction sites was generated by PCR amplification from a cDNA clone (ATCC, Cat. no. MGC-8378] with the following primers: sense 5'-GGGAATTCATGGCGCAGACGCAGGGC-3' and antisense 5'-CGGAATTCTCAGGCCAACTTGACCTC -3'. The PCR product was digested by EcoRI and inserted into pBact-FLAG vector to generate p-FLAG-HDAC1. The pBact-FLAG vector was derived from pBact-myc (Cravchik et Matus, 1993) where the myc tag was replaced by a FLAG tag. To generate His<sub>6</sub>-HDAC1 expression vector, the HDAC1 cDNA was subcloned from p-FLAG-HDAC1 into the EcoRI site of pTrcHis (B). All the constructs were verified by sequencing. The HIV-1 viral clones pNL4-3 and pNL4-3.Luc.R-E- were obtained through the NIH AIDS Research & Reference Reagent Program (Adachi *et al.*, 1986 ; He *et al.*, 1995).



#### 4.6.3 siRNAs

All siRNAs used in this study were purchased from Qiagen: Hs\_HDAC1\_5 (Cat. no SI02634149) and Hs\_HDAC1\_6 (Cat. no SI02663472) target the 3'-UTR and the coding sequence, respectively, of the HDAC1 mRNA. The GFP-22 siRNA (Cat. no 1022064) was used as a negative control. siRNA transfection was performed using the HiPerfect transfection reagent (Qiagen) according to manufacturer's instructions.

#### 4.6.4 Production of viral stocks

HIV-1 virions were produced by transfection of 293T cells with the full-length infectious molecular clone, pNL4-3. Pseudotyped HIV-Luc virions were generated by co-transfecting the pNL4-3.Luc.R-E- plasmid and a VSV envelope construct. Cells were transfected with a modified version of the calcium phosphate transfection protocol (Cantin *et al.*, 1997). A semi-confluent culture of 293T cells was transfected with 20 µg of pNL4.3 plasmid or with 20 µg of pNL4-3.Luc.R-E- and 5µg VSV-G plasmids in 10 ml DMEM-complete. Cells were washed 24 h post transfection and cultured in fresh medium. Virion-containing supernatants were harvested 48 hours after transfection, centrifuged for 5 min at 700 x g, cleared by filtration through 0.22 µm pore-size filters, aliquoted and stored at -80°C. Virus stocks were assayed for virion content by using an in-house double-Ab sandwich ELISA specific for the viral p24<sup>gag</sup> protein, as described previously (Bounou, Leclerc et Tremblay, 2002). Recombinant HIV-1 p24 and anti-p24 antibodies used for the p24 ELISA were generous gifts from Dr. Michel Tremblay (CHUI Research Center, Québec, Canada). Before each infection experiment, the virus inoculum was treated with DNase I (1µg/ml) in the presence of MgCl<sub>2</sub> (1mM) for 30 minutes at 37°C to remove contaminating DNA.



#### 4.6.5 Immunoprecipitation experiments

293T-IN<sup>s</sup>ala and 293T cells were seeded ( $1 \times 10^6$  cells per 60 mm plate) and transfected with 4  $\mu$ g of p-FLAG-HDAC1 plasmid using the PolyFect reagent (Qiagen). Cells were washed 48h after transfection and lysed with cold modified RIPA buffer (50 mM Tris-HCl pH 7.4, 150 mM NaCl, 1% NP40, 0.25 % Sodium deoxycholate, 1 mM EDTA, 1 mM orthovanadate, 1 mM NaF) containing complete protease inhibitors (Roche) followed by centrifugation at 10,000 x g for 15 min to pellet cellular debris. Total cell lysates (400  $\mu$ g proteins) were next incubated at 4°C for 1 h with the following antibodies: rabbit HIV-1 HXB2 integrase antisera obtained from Dr. Duane P. Grandgenett (Grandgenett et Goodarzi, 1994) (NIH AIDS Research & Reference Reagent Program), rabbit polyclonal anti-FLAG (Sigma) or normal rabbit IgG (Santa Cruz Biotechnology). Protein G-sepharose beads (Invitrogen) were then added and incubation was continued overnight at 4°C with rotation. Beads were washed four times with 1 ml of modified RIPA buffer, and then eluted by heating at 95°C for 5 min in 50  $\mu$ l 2X electrophoresis sample buffer. Eluates were then resolved by 10% SDS-PAGE. Western blot analysis was carried out using a mixture of HIV-1 IN 8G4 and 2C11 monoclonal antibodies from Dr. Dag E. Helland (Nilsen *et al.*, 1996) (NIH AIDS Research & Reference Reagent Program) and the anti-FLAG-M2 monoclonal antibody (Sigma).

#### 4.6.6 Expression and purification of recombinant His<sub>6</sub>-tagged HDAC1

Recombinant His<sub>6</sub>-HDAC1 protein was expressed from pTrcHis in *E. coli* (DH10B). Expression was induced with 1 mM IPTG for 4h at 37°C. Bacteria were pelleted by centrifugation at 10,000 x g for 10 min and lysed in a ratio of 1 to 2g (wet weight)/5ml of lysis buffer (50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> pH 7.4, 0.5% Tween 20, 0.5% Triton X-100, 0.5% NP40, 1% SDS, 1mg/ml lysozyme and 1 $\mu$ g/ml benzonase) during 30 min on ice. After sonication, the lysates were cleared by centrifugation at 16,000 x g for 20 min at 4°C. Clarified lysates were incubated with the Ni-NTA His.Bond®

superflow resin (Novagen) equilibrated in Ni-NTA buffer [50 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  buffer pH 8.0, 150 mM NaCl and complete protease inhibitor (Roche)] in the presence of 30 mM imidazole during 2h at 4°C. The beads were then loaded into a column and washed with 10 column volumes of the same buffer. His-tag proteins were eluted with 250 mM imidazole in Ni-NTA buffer. Eluted fractions, separated on 10% SDS-PAGE and stained by Coomassie blue, were pooled and dialyzed against 20 mM HEPES pH 7.5, 1 mM DTT, 1 mM EDTA, 0.5 M NaCl and 10% glycerol.

#### **4.6.7 Affinity pull-down assay**

50  $\mu\text{l}$  of Ni-NTA His.Bond® superflow resin was incubated with 1 $\mu\text{g}$  of purified recombinant HIV-1<sub>NL4-3</sub> IN, obtained from Dr. Robert Craigie (Li et Craigie, 2005) (AIDS Research & Reference Reagent Program) and 5 $\mu\text{g}$  of purified His<sub>6</sub>-HDAC1 for 2h at 4°C in Ni-NTA buffer) containing 30 mM imidazole. After 4 washes, bound proteins were eluted with 250 mM imidazole in Ni-NTA buffer, resolved by 10% SDS-PAGE and analyzed by western blot.

#### **4.6.8 Transient knockdown/overexpression and multiple rounds infection**

HeLa-CD4 cells ( $8 \times 10^4$ ) were seeded in 24-well plates and, after 24h, transfected with 15 nM siRNAs or 375 ng of expression vectors. Infection was initiated at 48h post-transfection with (10 ng p24 of HIV-1 virions) in a 300  $\mu\text{l}$  total volume of infection medium (DMEM, 10% FBS, 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  G418, 50  $\mu\text{g}/\text{ml}$  hygromycin B) containing 8 $\mu\text{g}/\text{ml}$  polybrene. The medium was removed 3 hours after the infection and cells were washed and grown in fresh medium. To monitor the course of HIV-1 infection, cell free supernatants were harvested at different time points postinfection (pi) and virion production was measured by p24 quantification. In parallel, cells were harvested for further analysis. The experiments were performed in triplicate.

#### 4.6.9 Transient knockdown and single round infection

HeLa-CD4 cells were plated in 24-well plates and transfected with 20 nM siRNAs. Infection was initiated at 48h post-transfection with HIV-1 virions (30 ng p24 of per  $1 \times 10^5$  cells) as described above. HIV-1 infection was measured by quantification of luciferase activity in cell lysates 48h after the infection. Cells were also harvested at 24h, 48h and 6 days pi for viral DNA analysis.

#### 4.6.10 Gene expression analysis and quantitative RT-PCR

Total RNA was isolated from siRNA-transfected at different time points with TRIzol Reagent (Invitrogen) and 2.5 to 5  $\mu$ g of RNA samples were subjected to reverse transcription (RT) using Omniscript reverse transcriptase kit (Qiagen) and oligo(dT) primers. The amounts HDAC1 and  $\beta$ -actin (internal control) cDNAs were quantified by quantitative PCR, using SYBR Green Master Mix (Takara Bio, Inc.) and a LightCycler (Roche Diagnostics). PCR was conducted with 1.25-2.5 ng of cDNA in a 10  $\mu$ l final volume containing SYBR Green and 0.5  $\mu$ M HDAC1 or 0.25  $\mu$ M  $\beta$ -actin primers. The primer pairs were: HDAC1-sense 5'-TCCGAGACGGGATTGATGACG-3' and HDAC1-antisense 5'-CCCAGCATCAGCATAGGCAGG-3',  $\beta$ -actin sense 5'-GGGTCAGAAGGATTCCTATG-3' and  $\beta$ -actin antisense 5'-GGTCTCAAACATGATCTGGG-3'. The cycling conditions were as follows: initial denaturation at 95°C for 10 sec followed by 50 cycles of amplification (denaturation at 95°C for 5 sec, hybridization at 60-65°C for 20 sec and elongation at 72°C for 15 sec). Data were analyzed with the Real Quant Software (Roche Applied Science).

#### 4.6.11 MTS/PMS assay

The MTS/PMS assay was used to determine cell viability upon siRNA transfection at 24, 48 and 72 hours post transfection. Cells were first washed and incubated with 400  $\mu$ l of fresh medium for 1 hour at 37°C followed by the addition

of a combined solution of Tetrazolium salt [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium (MTS, promega) and phenazine methosulfate (PMS, Sigma) at a final concentrations of 333 µg/ml and 25 µM for MTS and PMS, respectively. After 1 h of incubation at 37°C, absorbance was recorded at 490 nm.

#### 4.6.12 Quantification of HIV-1 DNA species

DNA was isolated from siRNA-transfected HeLa-CD4 cells at different time point following the onset of infection (24, 48, and 72 h), using the FlexiGene DNA kit (Qiagen). All HIV-1 DNA species were analyzed by quantitative PCR as described by Suzuki et al. (Suzuki *et al.*, 2003). Briefly, integrated viral DNA was amplified by nested Alu PCR. The first PCR round was performed on 10 ng of DNA using an Alu-sequence-specific sense primer (5'-TCCCAGCTACTCGGGAGGCTGAGG-3') and a HIV-1 specific antisense primer M661 (5'-CCTGCGTCGAGAGATCTCCTCTG-3'). The second PCR was performed with a 500-fold dilution of the first round PCR product and allowed the amplification of R/U5 viral DNA portion using sense primer M667 (5'-GGCTAACTAGGGAACCCACTGC-3') and antisense primer AA55 (5'-CTGCTAGAGATTTTCCACACTGAC-3'). Quantification of 2-LTR circles was performed using the sense primer 2-LTR-S (5'-CCCTCAGACCCTTTTAGTCAGTG-3') and the antisense primer 2-LTR-AS (5'-TGGTGTGTAGTTCTGCCAATCA-3') through PCR analysis of 50 ng cellular DNA. The abundance of late RT products was quantified using the sense primer LG564 (5'-CCGTCTGTTGTGTGACTCTGGT-3') and the antisense primer LG699 (5'-GAGTCCTGCGTCGAGAGATCT-3') through PCR analysis of 10 ng cellular DNA. Total viral cDNA was quantified following PCR analysis of 10 ng cellular DNA with the M667 and AA55 primers. For each quantification, human β-globin DNA was used as an internal control and quantified with sense primer 5'-



CCCTTGGACCCAGAGGTTCT-3' and antisense primer 5'-CTCACTCAGTGTGGCAAAGGTG-3'. Each sample was run in triplicate. Negative PCR controls (no DNA added to the PCR mixture) were run with each experiment. DNA extracted from non-infected HeLa-CD4 cells was included in each experiment and used to subtract background amplification. All PCR amplifications were performed using a LightCycler (Roche Diagnostics) and the SYBR Green master mix (Takara bio Inc.). For each qPCR, a standard curve of the amplicon being measured was performed. The cycling conditions of qPCR included initial denaturation at 95°C for 10 min followed by 50 cycles of amplification (denaturation at 95°C for 15 sec and amplification at 60°C for 1 min).

#### 4.6.13 Luciferase assay

Transfected cells were lysed 24 hours after transfection while infected cells were lysed at 48 hours post-infection. Cells were resuspended in lysis buffer [25 mM Tris-H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> pH 7.8, 2 mM DTT, 1% (v/v) Triton X-100, 10% (v/v) glycerol], shaken for 30 min at room temperature and subjected to one freeze-thaw cycle. To 20 µl lysate, 100 µl of the Luciferase assay substrate [20 mM Tricine, 1.07 mM (MgCO<sub>3</sub>)<sub>4</sub>·Mg(OH)<sub>2</sub>·5H<sub>2</sub>O, 2.67 mM MgSO<sub>4</sub>, 0.1 mM EDTA, 270 µM coenzyme A, 470 µM D-luciferin, 530 µM ATP, and 33.3 mM DTT] (Fortin *et al.*, 1997) were added and luciferase activity was then measured with a Dynex MLX microplate luminometer (Dynex Technologies). Luciferase activity was expressed as relative light units (RLU), was normalized to protein content of the cell lysates, measured with the Bradford reagent (BioRad).

#### 4.6.14 Statistical analysis

Statistical analysis was performed using Prism Software (GraphPad). Differences between groups were examined for statistical significance using the Student's *t*-test. Results were considered significant when  $P < 0.05$ .

#### **4.7 Acknowledgements**

We thank Dr. Benoit Barbeau and Dr. Eric Cohen for their help and the access to their P3 laboratories. We thank Dr. Zeger Debyzer and Dr. Lionel Berthoux for their helpful critics and discussion of the manuscript. We are also very grateful for all the materials obtained from Prof. Hans Stahl and Dr. Uhlmann-Schiffler, Dr. Michel J Tremblay and through the NIH AIDS Research and Reference Reagent Program, Division of AIDS, NIAID, NIH. This work was supported by a NSERC grant to EE and ER.



#### 4.8 Figure legends

**Figure 4.1. HDAC1 specifically interacts with HIV-1 integrase.** (A) FLAG-tagged HDAC1 and HIV-1 integrase co-immunoprecipitate *in vivo*. 293T-IN<sup>s</sup>ala (stably expressing HIV-1 IN, +) or 293T cells (negative control, -) were transfected with pFLAG-HDAC1 expression vector. Cell lysates were then subjected to immunoprecipitation with anti-IN ( $\alpha$ -IN), anti-FLAG ( $\alpha$ -FLAG) or control IgG antibodies. Immunoprecipitates were analysed by Western blot with anti-IN or anti-FLAG antibodies. Total cell extracts (input) were analysed in parallel (B) Pull-down assay demonstrating direct interaction of HDAC1 with HIV-1 integrase. Purified integrase was incubated with purified His<sub>6</sub>-tagged HDAC1 or with Ni-NTA beads alone (negative control). Bound proteins were analyzed by western blot using anti-His or anti-IN antibodies. purified proteins before pull-down were also analysed.

**Figure 4.2. HDAC1 knockdown inhibits HIV-1 replication.** (A) HeLa-CD4-LTR- $\beta$ -gal cells were transfected with 15 nM siHDAC1 or siControl. Cells were subsequently infected with NL4.3 HIV-1 particles (10 ng p24 per  $8 \times 10^4$  cells) and supernatants were harvested at different time points postinfection (pi). Extracellular p24 levels were measured through an ELISA assay. (B) Analysis of the efficiency of transfected HDAC1 siRNAs. siRNA-transfected HeLa-CD4-LTR- $\beta$ -gal cells were harvested at indicated time points. Total RNA was isolated and analyzed by real-time RT-PCR. (C) Cell viability was determined at day 1, 2 and 3 after siHDAC1 transfection using the MTS/PMS assay and compared to viability of cells transfected with siControl (set as a value of 100). Results represent Means  $\pm$  SD for three parallel experiments.

**Figure 4.3. HDAC1 overexpression increases HIV-1 replication.** (A) HeLa-CD4-LTR- $\beta$ -gal cells were transfected with pFLAG-HDAC1 expression vector or the pBact-FLAG empty vector and then infected with HIV-1 NL4.3 virions (10 ng p24 per  $8 \times 10^4$  cells). Supernatants were harvested at 6 days postinfection and measured

for p24 levels through an ELISA assay. Means  $\pm$  SD for three parallel infections are presented. (B) Western blot analysis of total lysates of transfected cells (24 and 48h posttransfection, pt) was conducted with an anti-FLAG antibody.

**Figure 4.4. Knockdown of HDAC1 expression decreases HIV-1 late reverse transcription.** HeLa-CD4-LTR- $\beta$ -gal cells were transfected with 15 nM siHDAC1 or siControl and infected with HIV-1 NL4.3 virions (10 ng p24 per  $8 \times 10^4$  cells) 48h after transfection. At different time points postinfection, cells were harvested and DNA was extracted. (A) Total cDNA (B) late RT transcripts (C) Integrated viral DNA and (D) 2-LTR circles were quantified by real-time PCR as described in Materials and Methods. Results are expressed as percentage of the control. Data are means  $\pm$  SD of three independent experiments. \*,  $P < 0.05$ , \*\*\*,  $P < 0.001$ , \*\*\*\*,  $P < 0.0001$ .

**Figure 4.5. Knockdown of HDAC1 expression decreases the HIV-1 late reverse transcription in single round infection.** HeLa-CD4-LTR- $\beta$ -gal cells were transfected with 20 nM siHDAC1 (black columns) or siControl (white columns) and, at 48h post-transfection, infected with NL4.3-Luc virions (30 ng p24 per  $5 \times 10^5$  cells). (A) Late RT transcripts were quantified at 24h pi. (B) Integrated viral DNA content was quantified at day 6 pi. (C) Luciferase activity was measured in cell lysates at 48h postinfection. Results are expressed as percentage of the control. Results were calculated as means  $\pm$  SD of three independent experiments. \*,  $P < 0.05$ , \*\*,  $P < 0.01$ , \*\*\*,  $P < 0.001$ .

**Figure 4. 6. Knockdown of HDAC1 expression in infected cells does not affect post-integration steps.** (A) HeLa-CD4-LTR- $\beta$ -gal cells or (b-c) 293T cells were transfected with 20 nM siHDAC1 or siControl and, after 48h, co-transfected with pNL4-3.Luc.R-E- and pCMV-VSV-G. (A-B) Luciferase activity was measured in cell lysates at 24h post transfection and (C) viral production was assessed through

quantification of extracellular p24 levels 48h after transfection. Results were calculated as means  $\pm$  SD of three independent experiments

**Figure 4.7. Knockdown of HDAC1 expression in HIV-1 producer cells reduce virion infectivity in a cell type-dependent manner.** 293T cells were transfected with 20 nM siHDAC1 or siControl and, after 48h, co-transfected with pNL4-3.Luc.R-E- and pCMV-VSV-G. Equal amount of p24 from harvested supernatants (48h post-transfection) was added to (A) HeLa-CD4 (30 ng p24 per  $10^5$  cells) or (B) Jurkat cells (30 ng p24 per  $10^6$  cells) for infection. Luciferase activity was measured at 48h pi and normalized to protein content. Infectivity was calculated as a percentage of the control. Results are means  $\pm$  SD of triplicates. \*\*\*,  $P < 0.001$ .

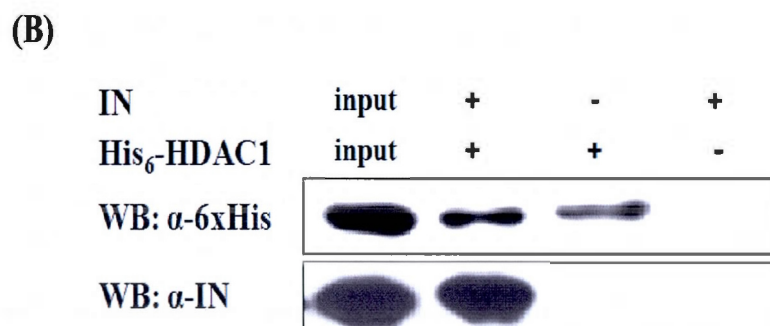
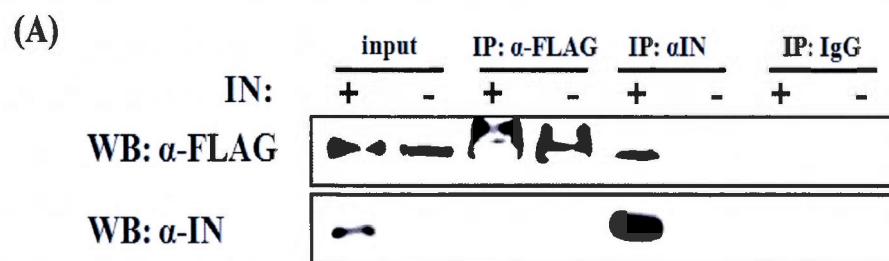
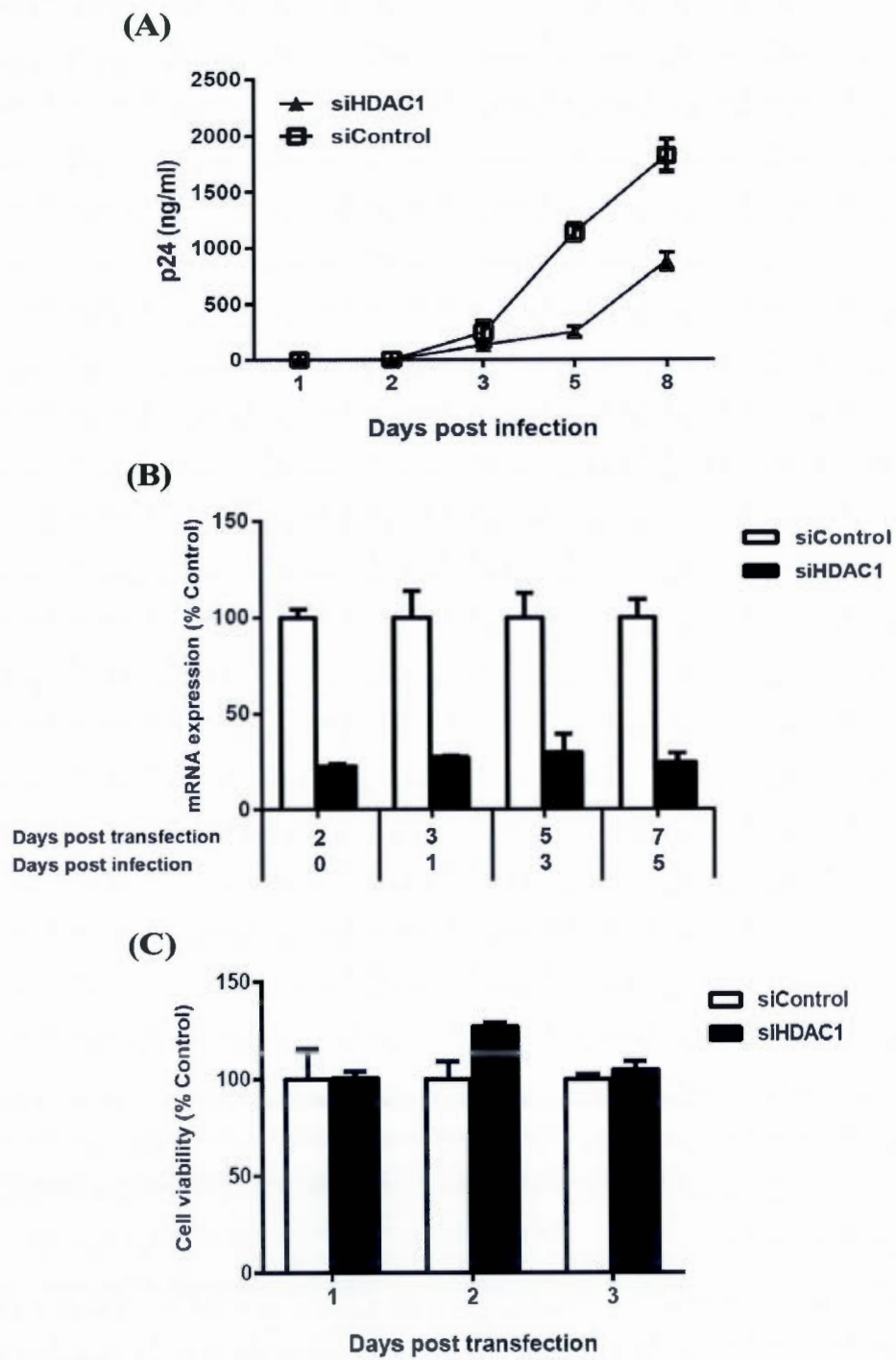
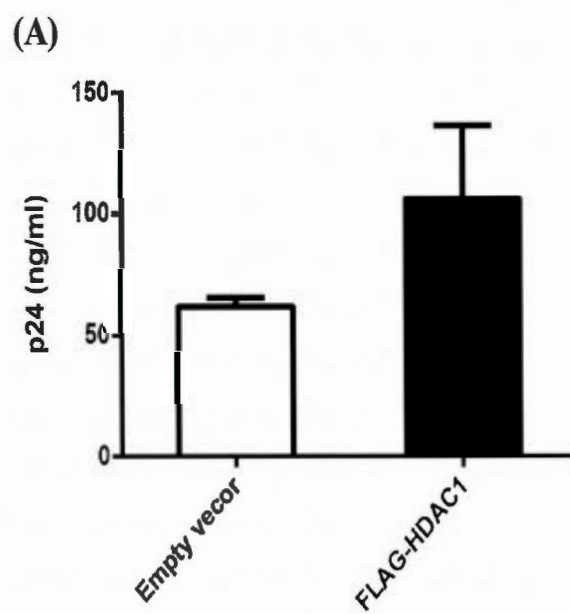
**Figure 4.1**

Figure 4.2



**Figure 4.3**

(B)

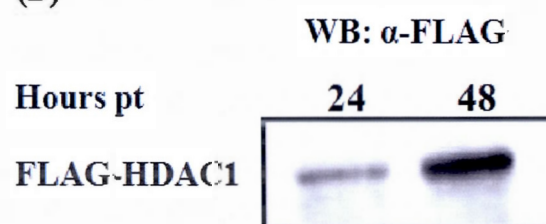




Figure 4.4

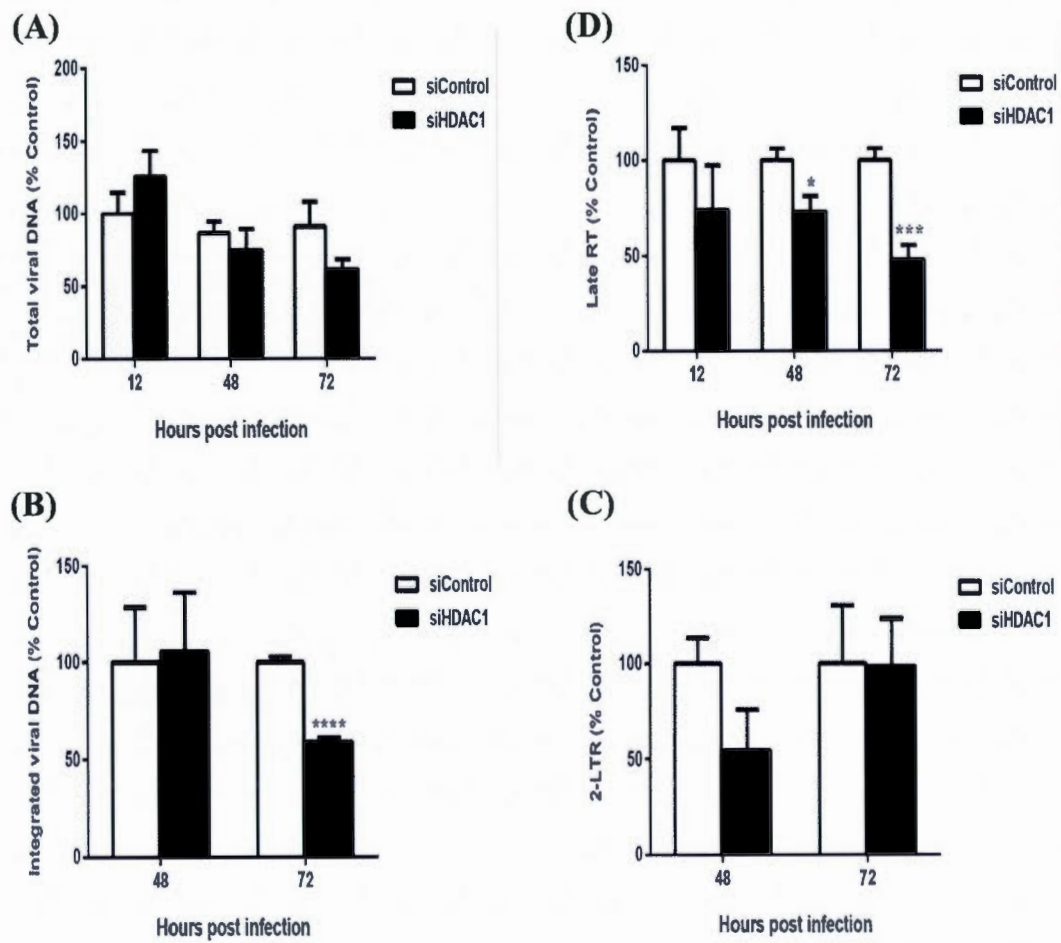


Figure 4.5

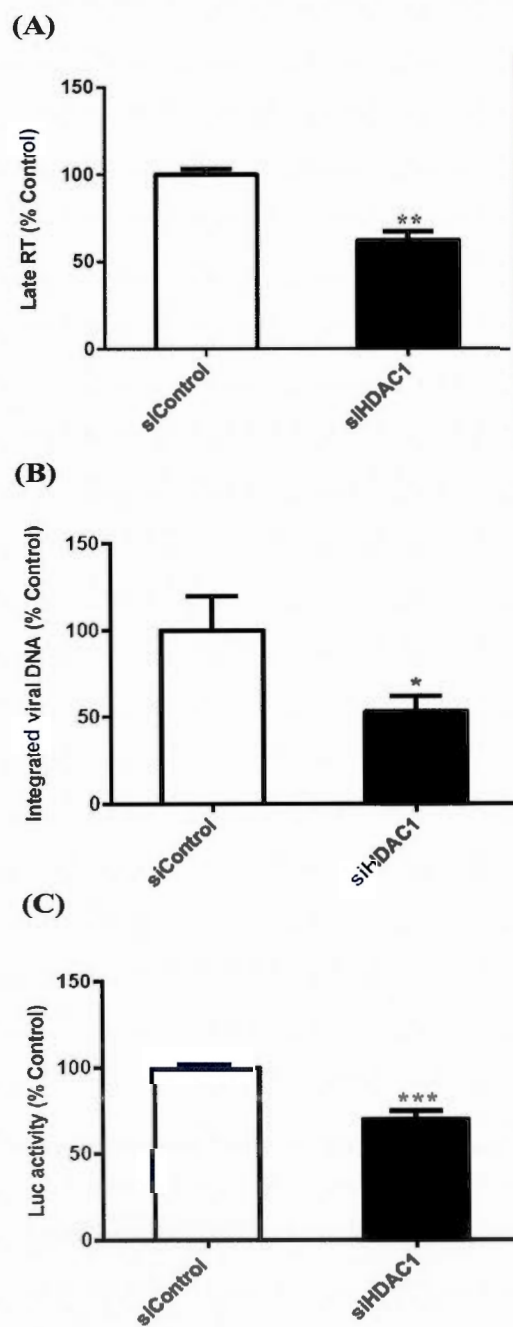


Figure 4.6

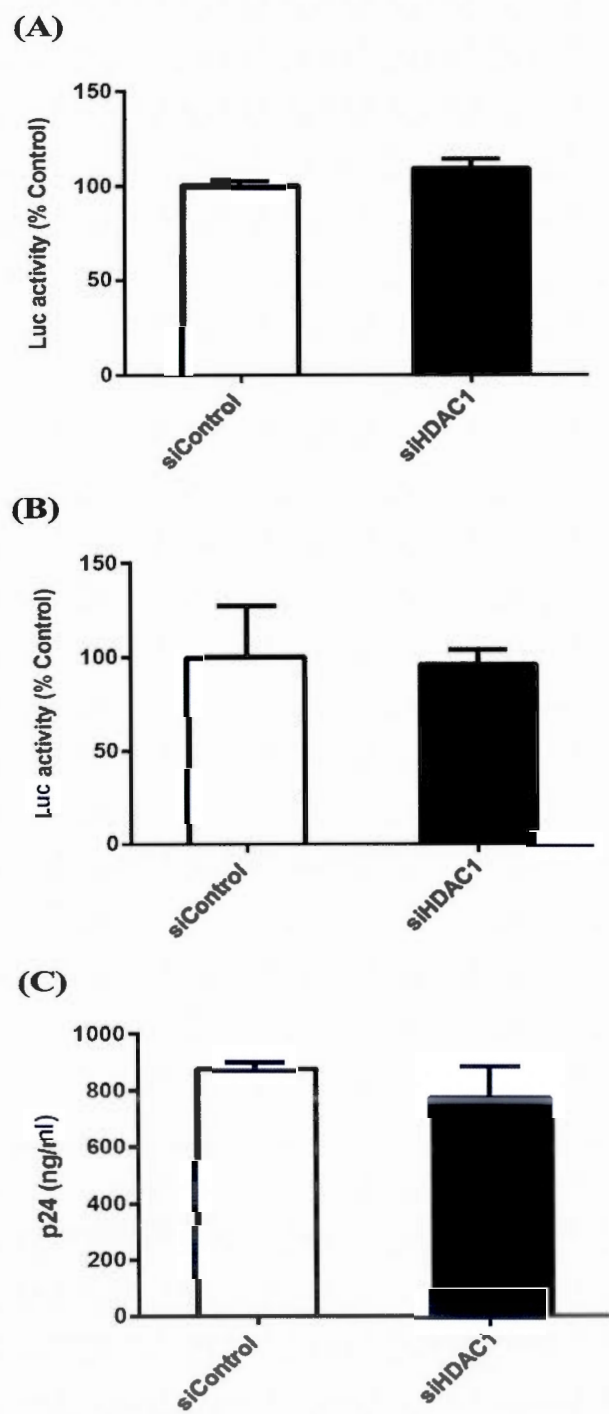
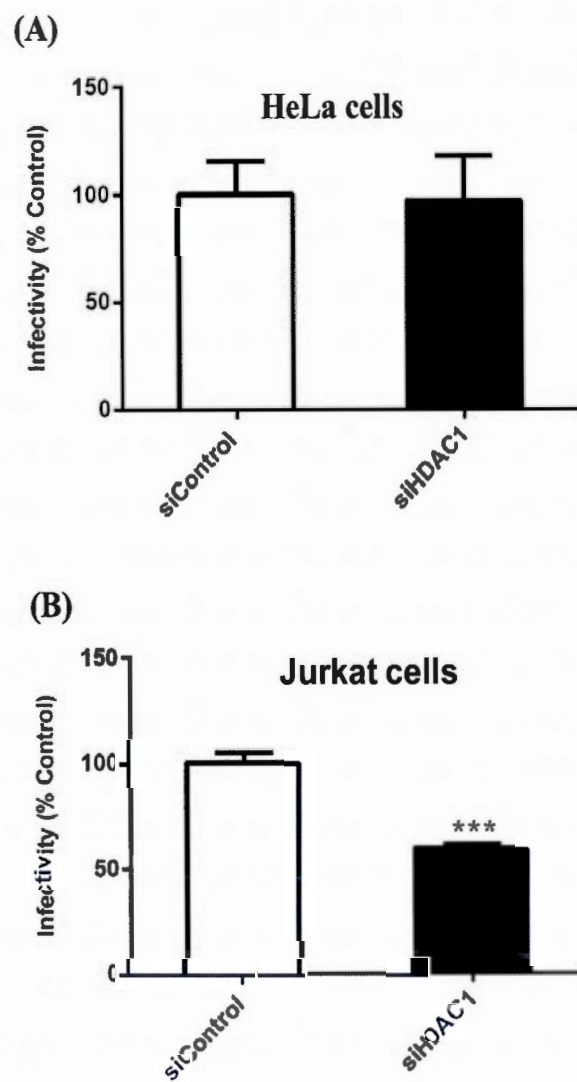


Figure 4.7



## CHAPITRE V

### DISCUSSION GÉNÉRALE

Au cours de la réplication du VIH-1, l'intégrase virale assure l'intégration du génome viral dans le chromosome cellulaire, une étape essentielle à l'établissement d'une infection productive. En plus de l'intégration, l'intégrase joue des rôles importants à différentes étapes notamment la décapsidation, la transcription inverse, l'import nucléaire de l'ADN viral et la maturation des virions (Briones, Dobard et Chow, 2010 ; Hehl *et al.*, 2004 ; Ikeda *et al.*, 2004 ; Jayappa *et al.*, 2011 ; Mohammed, Topper et Muesing, 2011 ; Wilkinson *et al.*, 2009 ; Zhu, Dobard et Chow, 2004).

Plusieurs études ont été consacrées à l'identification des facteurs cellulaires qui interagissent avec l'intégrase dans l'optique de définir de nouvelles cibles thérapeutiques et de nombreux cofacteurs de l'intégrase ainsi identifiés ont été validés dans les systèmes de culture cellulaire. Dans cette même optique et comme présenté dans le chapitre I, nous avons utilisé un système de séparation biotine-streptavidine où un ADN reproduisant une portion du U3-LTR viral et renfermant un site d'attachement de l'intégrase a été utilisé comme appât. Les protéines co-purifiées avec l'intégrase par ce système ont été ensuite analysées par spectrométrie de masse. Les principaux éléments qui ressortent de l'analyse des résultats de la spectrométrie de masse sont :

1) De nombreuses protéines purifiées sont déjà connues dans la littérature comme cofacteurs de l'intégrase du VIH-1. Certaines de ces protéines ont été identifiées avec un score élevé telles que XRCC5 (Li *et al.*, 2001), FEN1 (Faust et Triller, 2002), PARP-1 (Ha *et al.*, 2001), les protéines à boîte HMG (Hindmarsh *et al.*, 1999) et HDAC1 (Allouch *et al.*, 2011). D'autres protéines par contre comme LEDGF/p75 (Cherepanov *et al.*, 2003), INI1 (Kalpana *et al.*, 1994), HSP60 (Parissi *et al.*, 2001) et emerin (Jacque et Stevenson, 2006) avaient un score beaucoup plus faible (Table 2.1).

2) Parmi les protéines purifiées, plusieurs figurent sur la liste des protéines identifiées par les criblages à haut débit du génome humain comme facteurs cellulaires pouvant avoir un rôle dans la réplication du VIH-1 (Konig *et al.*, 2008 ; Zhou *et al.*, 2008a). C'est l'exemple des protéines USP39, GTF2F1, TERF2, POLR2H, MRE11A, HMGB1 et HDAC1. Par ailleurs, certaines protéines (HDAC1, HSP70, DDX17, HIST1H2BN, XRCC5, PARP-1, INI1, EMD, LEDGF/p75, HSP60) apparaissent comme cofacteurs de l'intégrase dans des études de prédiction des interactions du VIH-1 avec son hôte (Tastan *et al.*, 2009).

3) Les protéines purifiées ont des fonctions très diverses dont certaines peuvent être associées à l'intégration ou à d'autres fonctions de l'intégrase, en particulier la recombinaison et la réparation de l'ADN ainsi que le remodelage de la chromatine.

4) Une grande partie des protéines identifiées est impliquée dans le métabolisme de l'ARN. En effet, les RNA hélicases et les protéines hnRNP (*Heterogeneous nuclear ribonucleoproteins*) sont parmi les protéines les plus abondantes dans la fraction co-purifiée avec l'intégrase.

5) Les facteurs de transcriptions capables de se lier au LTR viral ainsi que les protéines liant l'ADN ne sont pas très représentés dans l'analyse de spectrométrie



bien que l'appât utilisé dans la purification soit de l'ADN correspondant à une portion du LTR.

Les constats présentés ci-dessus démontrent l'efficacité de l'approche expérimentale que nous avons conçue et la valeur des protéines identifiées en tant que partenaires potentiels de l'intégrase du VIH-1 dont il serait intéressant d'étudier l'interaction avec l'intégrase, l'impact sur l'intégration et sur la réplication virale en général. Ceci permettrait d'approfondir nos connaissances concernant le rôle de l'intégrase et éventuellement identifier de nouvelles cibles thérapeutiques. Le nombre élevé des protéines identifiées et leur diversité fonctionnelle peuvent refléter le rôle polyvalent que l'intégrase accomplit durant le cycle viral et les différentes interactions que cette polyvalence implique. Néanmoins, nous ne pouvons pas exclure la possibilité que certaines protéines soient associées à l'intégrase de manière indirecte. La présence de faux positifs en particulier les facteurs de transcription et les protéines de liaison à l'ADN est également possible mais il est clair que leur proportion est faible.

Le nombre et l'abondance des RNA hélicases co-purifiées avec l'intégrase sont remarquables. Il est bien établi que le VIH-1, comme la plupart des virus, utilise les RNA hélicases de la cellule infectée pour accomplir son cycle de réplication. Plusieurs RNA hélicases cellulaires se sont avérées importantes pour la réplication du VIH-1 à travers leur interaction avec les protéines virales, en particulier Rev mais également Gag (Cocude *et al.*, 2003 ; Fang *et al.*, 2004 ; Li *et al.*, 1999 ; Ma *et al.*, 2008 ; Naji *et al.*, 2012 ; Reed *et al.*, 2012 ; Robertson-Anderson *et al.*, 2011 ; Roy *et al.*, 2006 ; Xing, Liang et Kleiman, 2011 ; Yedavalli *et al.*, 2004). Seule DDX5 a été identifiée dans un criblage double-hybride comme partenaire potentiel de l'intégrase de MuLV (Studamire et Goff, 2008).

Nous avons identifié les RNA hélicases DDX5 et DDX17 comme partenaires d'interaction potentiels de l'intégrase du VIH-1. Dans le deuxième chapitre du

présent travail, nous avons dans un premier temps confirmé l'interaction de ces protéines avec l'intégrase par co-immunoprécipitation et par pull-down. Ensuite, nous avons étudié l'impact de ces protéines sur l'intégration et sur la réplication virale de façon plus générale. Les RNA hélicases DDX5 et DDX17 sont structurellement et fonctionnellement très proches. Elles ont une activité RNA hélicase dépendante de l'ATP et sont caractérisées par la présence, dans leur domaine catalytique, d'une boîte DEAD (résidus d'acides aminés Asp-Glu-Ala-Asp). Elles ont par ailleurs une configuration modulaire où le domaine catalytique conservé est lié à des domaines responsables d'interactions protéine-protéine ou protéine-ARN variées. Les deux hélicases interviennent dans différents processus impliquant le réarrangement de structures ARN-protéine tels que la transcription, l'épissage, la traduction ainsi que la maturation des microARNs mais elles peuvent également fonctionner indépendamment de leur activité hélicase (Janknecht, 2010 ; Ranji et Boris-Lawrie, 2010) .

En général, les RNA hélicases interviennent dans la réplication du VIH-1 comme celle des autres virus de deux façons: (i) En tant que cofacteurs enzymatiques favorisant une utilisation optimale de l'ARN viral durant les différentes étapes de la réplication. (ii) En tant que "senseurs" cellulaires dont les interactions protéine-protéine ou protéine-ARN peuvent induire ou bloquer la réponse antivirale de la cellule (Ranji et Boris-Lawrie, 2010).

Dans notre étude et d'une manière globale, nous avons trouvé que DDX5 et DDX17 facilitent la réplication du VIH-1. Cet effet a été mis en évidence en inhibant l'expression de l'une ou de l'autre protéine par siRNA dans des cellules HeLa infectées. L'analyse détaillée a montré que les deux protéines interviennent à plus d'une étape du cycle de réplication viral. Durant les étapes précoces, DDX17 augmente l'intégration alors que DDX5 semble faciliter la transcription inverse. Aux étapes tardives c.-à-d. post-intégration, les deux protéines ont montré un effet

inhibiteur de l'expression du provirus, mesurée par un rapporteur luciférase. Par ailleurs, DDX5 et DDX17 se sont avérées importantes pour la production de particules virales infectieuses. Ces effets multiples et parfois opposés des RNA hélicases ne sont pas surprenants et témoignent de la complexité de la régulation que ces protéines exercent sur la réplication du virus. Un exemple probant est fourni par la RNA hélicase DHX30 dont la surexpression augmente l'expression du provirus VIH-1 mais diminue l'empaquetage de l'ARN viral dans les virions naissants, entraînant une diminution de leur infectivité (Zhou *et al.*, 2008b). La complexité des fonctions des RNA hélicases est bien connue et doit être attribuée à la diversité de leurs substrats et de leurs partenaires d'interaction, que ça soit dans un contexte cellulaire normal ou dans le cas d'une infection virale.

Il est probable que DDX5 facilite la transcription inverse à travers des réarrangements ribonucléoprotéiques dans le complexe de la transcription inverse. Il est également probable que cet effet facilitateur fait intervenir l'activité enzymatique de la protéine. Le cas de DDX5 est à rapprocher de celui de la RNA hélicase A (RHA) qui facilite la transcription inverse du VIH-1 en augmentant l'hybridation du tRNA<sub>3</sub><sup>Lys</sup> et ce à travers l'induction de changements conformationnels dans l'ARN viral. Le rôle positif de DDX17 dans l'intégration peut mettre en jeu des interactions protéine-protéine pour recruter des protéines en particulier celles impliquées dans la réparation de l'ADN pour faciliter l'intégration. Un rôle de DDX17 dans la réparation de l'ADN à travers le dégagement de l'ARN des sites endommagés dans les régions en transcription, tel que décrit pour DDX1, est aussi possible (Li, Monckton et Godbout, 2008).

Les RNA hélicases DDX5 et DDX17 sont connues pour leur rôle dans la régulation de l'expression de plusieurs gènes cellulaires, en tant que coactivateurs de la transcription mais également comme corépresseurs (Fuller-Pace et Moore, 2011). Les deux protéines sont également impliquées dans l'épissage alternatif qui est aussi

un moyen de régulation de l'expression des gènes quand il est couplé à la voie NMD (*nonsense-mediated mRNA decay*), par l'inclusion de codons stop prématurés (Germann *et al.*, 2012). DDX5 et DDX17 peuvent réguler l'expression d'une même protéine au niveau de la transcription et de l'épissage et les effets peuvent même être opposés. C'est le cas par exemple du gène NFAT5 dont DDX5 et DDX17 coactivent la transcription mais régulent à la baisse le niveau protéique en favorisant l'inclusion d'un codon stop prématuré (Germann *et al.*, 2012). Ceci apporte un degré de complexité supplémentaire à la régulation exercée par ces deux hélicases. Le rôle de DDX5 et DDX17 dans la maturation des microRNAs, en association avec Drosha, est un autre niveau où ces protéines interviennent pour réguler l'expression de certains gènes (Davis *et al.*, 2008 ; Fukuda *et al.*, 2007 ; Suzuki *et al.*, 2009). Dans le cas de l'expression du VIH-1, DDX17 semble exercer son effet inhibiteur, au moins en partie, en favorisant la dégradation de l'ARN viral. Il a été montré que DDX7 sert d'adaptateur entre la protéine antivirale ZAP (*zinc-finger antiviral protein*) et des ribonucléases cellulaires (Chen *et al.*, 2008 ; Zhu *et al.*, 2011). Le rôle de DDX5 par contre n'a pas encore été élucidé.

Le contrôle de l'expression du VIH-1 par DDX5 et DDX17 *via* leur interaction avec l'intégrase n'est pas sans précédent. En effet, il existe des données dans la littérature qui montrent que certains facteurs cellulaires sont recrutés par l'intégrase pour moduler l'expression (la transcription) du provirus après son intégration, comme par exemple les protéines HMGA1, BAF, EED, INI1/hSNF5 et YY1 (Boese *et al.*, 2009 ; Easley *et al.*, 2010a ; Henderson *et al.*, 2004 ; Inayoshi *et al.*, 2010 ; Witte *et al.*, 2004). DDX5 et DDX17 interagissent avec la protéine virale Rev dont les rôles dans l'export nucléaire, la traduction et l'encapsidation de l'ARN viral ont été décrits (Brandt *et al.*, 2007 ; D'Agostino *et al.*, 1992 ; Groom *et al.*, 2009 ; Naji *et al.*, 2012 ; Perales, Carrasco et Gonzalez, 2005). Ainsi, il est possible que les deux hélicases modulent l'expression du VIH-1 à travers cette interaction. Il serait intéressant de définir à quel(s) niveau(x) (transcription, épissage, export nucléaire,

traduction, maturation des microRNAs...) les deux hélicases exercent leur contrôle sur l'expression du VIH-1 et quelle est la signification de ce contrôle. Serait-ce une façon pour le virus d'éviter une expression trop forte ou une réponse antivirale de la cellule que le virus n'a pas su contourner. DDX5 et DDX17 facilitent les étapes précoces de la réplication du VIH-1 mais en même temps inhibent l'expression du provirus intégré. Par ailleurs, et étant donné que les deux protéines se sont avérées nécessaires à la production de particules virales infectieuses, leur effet global se traduit par une augmentation de la réplication. Le rôle de DDX5 et DDX17 dans la régulation de l'expression du provirus pourrait alors servir à déjouer la réponse antivirale de la cellule.

L'inhibition de l'expression de DDX5 et DDX17 dans les cellules productrices se manifeste par une diminution de la réplication virale dans les cellules infectées. L'implication de DDX5 et DDX17 dans l'infectivité du VIH-1 peut se situer à plusieurs niveaux, comme déjà décrit pour d'autres RNA hélicases (Burdick *et al.*, 2010 ; Ma *et al.*, 2008 ; Roy *et al.*, 2006 ; Xing, Liang et Kleiman, 2011 ; Zhou *et al.*, 2008b). Les deux protéines peuvent agir pour assurer un assemblage ou une maturation correcte des particules virales. Elles peuvent aussi favoriser l'empaquetage de l'ARN viral dans les virions. Il est également possible que ces deux hélicases recrutent un facteur cellulaire nécessaire à la réplication pour son incorporation dans les virions. L'incorporation de DDX5 et DDX17 elles-mêmes dans les virions, pour faciliter les étapes précoces dans les cellules infectées, n'est pas à exclure.

Il est primordial de comprendre comment les RNA hélicases DDX5 et DDX17 affectent l'infectivité du VIH-1 car il apparaît, d'après nos résultats, que c'est un impact positif majeur que ces protéines ont sur la réplication du virus. Il est aussi essentiel de savoir si ces protéines sont pertinentes pour la réplication du VIH-1 *in vivo* dans les cellules cibles dans le contexte d'une infection. A ce titre, il est



intéressant de savoir que l'expression de DDX5 et DDX17 dans les cellules T CD4+ a déjà été démontrée (Su *et al.*, 2004). De plus, l'interaction de DDX5 avec l'intégrase de MuLV suggère que cette protéine est importante non seulement pour la réplication du VIH-1 mais aussi pour d'autres rétrovirus.

Dans le contexte de la recherche de cibles thérapeutiques antivirales, l'inhibition des RNA hélicases cellulaires est envisagée. Une preuve de concept de cette approche est apportée par le développement récent d'inhibiteurs de la RNA hélicase DDX3, ceux-ci ayant montré une activité antivirale importante et peu d'effets cytotoxiques (Maga *et al.*, 2008 ; Maga *et al.*, 2011 ; Radi *et al.*, 2012). En ce qui concerne DDX5 et DDX17 et compte tenu de leurs effets opposés dans les différentes étapes du cycle de réplication viral, il est particulièrement important de définir par une analyse mutationnelle lequel des effets, positif ou/et négatif, implique l'activité ATPase/RNA hélicase car pour toute protéine, l'activité enzymatique est plus facile à cibler par des molécules pharmacologiques que les autres fonctions.

Comme nous l'avons déjà mentionné, l'histone désacetylase 1 (HDAC1) figurait parmi les protéines que nous avons co-purifiées avec l'intégrase du VIH-1 dans le crible réalisé avec les billes de streptavidine. Dans le troisième chapitre, nous nous sommes intéressés à étudier le rôle que joue cette protéine dans le cycle de réplication du VIH-1. Le lien de HDAC1 avec l'intégrase a récemment été décrit dans des travaux concomitants au nôtre (Allouch *et al.*, 2011 ; Sorin *et al.*, 2009). De notre part, nous avons confirmé cette interaction par co-immunoprécipitation et par pull-down.

En inhibant l'expression de HDAC1 par siRNA, nous avons montré que cette protéine facilite la réplication du VIH-1 dans les cellules HeLa. Nos résultats indiquent que HDAC1 intervient à une étape précédant l'intégration, probablement au niveau de la transcription inverse. Les travaux publiés par l'équipe de Kalpana, en accord avec nos résultats, montrent justement que HDAC1 est incorporée dans la



particule virale du VIH-1 de manière dépendante de l'intégrase et qu'elle facilite la transcription inverse dans les cellules infectées (Sorin *et al.*, 2009). En revanche, les travaux publiés par Allouch et ses coll. (Allouch *et al.*, 2011) indiquent que HDAC1 exerce un effet négatif sur l'intégration de l'ADN viral à travers la désacétylation de l'intégrase. Or, l'impact de l'acétylation/désacétylation de l'intégrase sur l'intégration est sujet à controverse (Cereseto *et al.*, Terreni *et al.*, 2010; Topper *et al.*, 2007). Ainsi, il reste à déterminer si HDAC1 facilite la transcription inverse en désacétylant l'intégrase. La comparaison des niveaux d'acétylation de l'intégrase à la suite d'une infection dans des cellules déplétées en HDAC1 et des cellules contrôles devrait apporter des éléments de réponse à cette question. Il n'est donc pas clair comment HDAC1, en interagissant avec l'intégrase, affecte la transcription inverse bien que des cofacteurs de l'intégrase tels que INI1 et Gemin2 agissent de façon similaire (Hamamoto *et al.*, 2006 ; Maroun *et al.*, 2006 ; Nishitsuji *et al.*, 2009 ; Turelli *et al.*, 2001). A ce titre, l'exemple d'INI1 est assez intéressant étant donné que cette protéine, à l'instar de HDAC1, intervient dans le remodelage de la chromatine et le contrôle de l'expression du VIH-1. Il est possible que HDAC1 agisse en catalysant la désacétylation d'une protéine impliquée directement ou indirectement dans la transcription inverse, en modulant sa stabilité et/ou ses interactions. L'une des protéines candidates serait p21<sup>WAF1/Cip1</sup> (Bergamaschi *et al.*, 2009).

La protéine HDAC1 affecte aussi l'infektivité du virus et la réduction de son expression dans les cellules productrices donne naissance à des virions peu infectieux. Cependant, cet effet dépend du type des cellules infectées. Il se manifeste dans les cellules Jurkat mais pas dans les cellules HeLa. La faible expression de HDAC2 dans les cellules Jurkat (Hassig *et al.*, 1998) pourrait expliquer cette différence et suggère par ailleurs que HDAC1 agit en association avec HDAC2 sous forme d'un hétérodimère, une hypothèse qui pourrait être vérifiée par l'infection de cellules HeLa déplétées en HDAC2 par des virions produits dans des cellules déplétées en HDAC1.

Nous avons montré, par siRNA, que la protéine HDAC1 n'intervient pas dans le contrôle de l'expression du VIH-1 dans les cellules HeLa ni dans les cellules 293T. Le rôle des HDACs dans la régulation de l'expression des gènes *via* le remodelage de la chromatine est bien établi. les HDACs sont généralement associés à une chromatine condensée et répressive (Yang et Seto, 2007). Il existe quatre classes de HDACs: classe I à IV, la classe I renfermant HDAC1, 2, 3 et 8 (Bolden, Peart et Johnstone, 2006). Le rôle des HDACs, en particulier les membres de la classe I, dans le contrôle de l'expression du VIH-1 et leur interaction avec le LTR viral dans le cas de la latence ont été largement étudiés (Archin *et al.*, 2009 ; Coull *et al.*, 2000 ; Imai et Okamoto, 2006 ; Jiang *et al.*, 2007 ; Marban *et al.*, 2007 ; Tyagi et Karn, 2007 ; Williams *et al.*, 2006 ; Ylisastigui *et al.*, 2004). Leur rôle dans la répression de l'expression du VIH-1 a été mis en évidence en démontrant l'activation de l'expression du virus par les inhibiteurs des HDACs dans les cellules CD4+ latentes obtenues de patients infectés (Archin *et al.*, 2009 ; Ylisastigui *et al.*, 2004). Par ailleurs, une association des HDAC1, HDAC2 et HDAC3 avec le LTR du VIH-1 a été mise en évidence dans les modèles cellulaires de latence virale (Coull *et al.*, 2000 ; Imai et Okamoto, 2006 ; Jiang *et al.*, 2007 ; Keedy *et al.*, 2009 ; Marban *et al.*, 2007 ; Tyagi et Karn, 2007 ; Williams *et al.*, 2006). Les inhibiteurs des HDACs ne sont pas sélectifs et ne permettent pas de déterminer la part de chacune des enzymes dans la régulation de l'expression du VIH-1. En utilisant les siRNAs, Keedy et ses collaborateurs ont montré que l'expression du LTR viral n'est pas contrôlée par HDAC1 mais plutôt par HDAC2 et HDAC3, bien que les trois protéines soient recrutées au LTR (Keedy *et al.*, 2009). Leurs résultats soulignent par ailleurs un rôle majeur pour HDAC2 dont la réduction n'est pas compensée par les autres HDACs malgré la redondance de ces protéines. Les résultats publiés par l'équipe de Kalpana également vont dans ce sens et montrent que l'inhibition de l'expression de HDAC1 par siRNA n'affecte pas la production des particules virales (Sorin *et al.*, 2009). Ces résultats, tout comme les nôtres, ont été obtenus dans des cellules HeLa et des cellules 293T et il serait plus pertinent d'évaluer le rôle des HDACs (HDAC1-3) dans

des cellules T CD4<sup>+</sup> primaires ou transformées et idéalement dans les cellules T CD4<sup>+</sup> de patients sous thérapies antivirales actives (HAART).

Chez les patients infectés et soumis aux traitements antiviraux, existent des cellules dites réservoirs (cellules T CD4<sup>+</sup> mémoires, macrophages, cellules dendritiques et autres) qui sont infectées de manière latente où l'ADN viral est intégré mais ne s'exprime pas. L'arrêt des traitements chez ces patients s'accompagne d'une réémergence rapide de la virémie, ce qui représente un obstacle de taille à l'éradication du VIH-1 et impose le maintien des thérapies antivirales à vie (Chun *et al.*, 1995 ; Finzi *et al.*, 1997 ; Piatak *et al.*, 1993 ; Wong *et al.*, 1997). Une approche actuellement à l'étude pour éliminer ces réservoirs viraux vise à réactiver l'expression virale tout en maintenant les traitements. A cet égard, l'utilisation des inhibiteurs des HDACs en association avec les HAARTs est une option thérapeutique qui est en cours d'évaluation (Colin et Van Lint, 2009 ; Wightman *et al.*, 2012).

Contrairement à l'utilisation des inhibiteurs des HDACs, les études basées sur l'inhibition spécifique par siRNAs permettent d'évaluer la contribution de chacune des HDACs au contrôle de l'expression du VIH-1 et également aux autres étapes de la réplication virale qu'il serait intéressant d'investiguer. Ceci permettrait de cibler de manière plus spécifique les HDACs à inhiber et d'éviter ainsi les effets toxiques que pourraient engendrer l'inhibition globale de ces protéines. Dans le contexte de la nouvelle approche thérapeutique où les HAARTs sont associés à l'inhibition des HDACs, il est important de s'assurer que l'inhibition des HDACs ne facilite pas la réplication ou la propagation des particules virales générées suite à la réactivation de l'expression du virus intégré. Ainsi, il est essentiel d'évaluer l'impact de ces protéines individuellement et en combinaison sur toutes les étapes de la réplication virale.

Dans la présente étude, nous avons montré que les RNA hélicases DDX5 et DDX17 interagissent avec l'intégrase du VIH-1. Nous avons également démontré l'interaction de HDAC1 avec l'intégrase. Il est connu que les RNA hélicases DDX5

et DDX17 interagissent avec HDAC1 et l'implication de ces trois protéines, ensemble, dans le contrôle de la transcription de certains gènes a déjà été décrite (Wilson *et al.*, 2004). Leur interaction avec l'intégrase suggère que cette dernière pourrait recruter un complexe préexistant comprenant, entre autres, les RNA hélicases DDX5 et DDX17 ainsi que HDAC1 pour faciliter la transcription inverse et l'intégration. Il est aussi probable que ce même complexe reste lié au provirus intégré pour moduler son expression. La régulation à la baisse de l'expression à cette étape pourrait être un moyen pour le virus d'échapper à la réponse antivirale de la cellule. Par ailleurs, l'interaction des RNA hélicases DDX5 et DDX17 avec Rev rapportée récemment (Naji *et al.*, 2012) soulève la possibilité d'une régulation par ces hélicases de l'interaction entre Rev et l'intégrase, une interaction qui est connue pour inhiber l'activité catalytique de l'intégrase et aussi son import nucléaire (Benyamini, Loyter et Friedler, 2011 ; Levin *et al.*, 2010a, 2010b). Ainsi, il est raisonnable de penser que l'intégrase du VIH-1 soit au cœur d'un complexe formé par les RNA hélicases DDX5 et DDX17, Rev, HDAC1 et certainement d'autres protéines pour assurer la synthèse de l'ADN viral et son intégration dans le génome de la cellule hôte. Ce complexe, probablement dynamique à cause des modifications post-traductionnelles de ces composants, pourrait accompagner l'ADN viral dans le noyau et contrôler son expression après l'intégration. De plus, Certains éléments de ce complexe joueraient aussi un rôle dans les étapes tardives du cycle viral pour permettre la production de particules virales infectieuses.

## RÉFÉRENCES

- Adachi, A., H. E. Gendelman, S. Koenig, T. Folks, R. Willey, A. Rabson et M. A. Martin. 1986. «Production of acquired immunodeficiency syndrome-associated retrovirus in human and nonhuman cells transfected with an infectious molecular clone». *J Virol*, vol. 59, no 2, p. 284-291. En ligne. <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3016298>>.
- Adamson, C. S., et E. O. Freed. 2008. «Recent progress in antiretrovirals--lessons from resistance». *Drug Discov Today*, vol. 13, no 9-10, p. 424-432. En ligne. <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18468560>>.
- Adamson, C. S., et I. M. Jones. 2004. «The molecular basis of HIV capsid assembly--five years of progress». *Rev Med Virol*, vol. 14, no 2, p. 107-121. En ligne. <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15027003>>.
- Agostini, I., S. Popov, J. Li, L. Dubrovsky, T. Hao et M. Bukrinsky. 2000. «Heat-shock protein 70 can replace viral protein R of HIV-1 during nuclear import of the viral preintegration complex». *Exp Cell Res*, vol. 259, no 2, p. 398-403. En ligne. <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10964507>>.
- Akari, H., S. Bour, S. Kao, A. Adachi et K. Strebel. 2001. «The human immunodeficiency virus type 1 accessory protein Vpu induces apoptosis by suppressing the nuclear factor kappaB-dependent expression of antiapoptotic factors». *J Exp Med*, vol. 194, no 9, p. 1299-1311. En ligne. <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11696595>>.
- Al-Mawsawi, L. Q., et N. Neamati. 2007. «Blocking interactions between HIV-1 integrase and cellular cofactors: an emerging anti-retroviral strategy». *Trends Pharmacol Sci*, vol. 28, no 10, p. 526-535. En ligne. <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17888520>>.
- Allouch, A., C. Di Primio, E. Alpi, M. Lusic, D. Arosio, M. Giacca et A. Cereseto. 2011. «The TRIM family protein KAP1 inhibits HIV-1 integration». *Cell*



- Host Microbe*, vol. 9, no 6, p. 484-495. En ligne. <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21669397>>.
- Ao, Z., K. Danappa Jayappa, B. Wang, Y. Zheng, S. Kung, E. Rassart, R. Depping, M. Kohler, E. A. Cohen et X. Yao. 2010. «Importin alpha3 interacts with HIV-1 integrase and contributes to HIV-1 nuclear import and replication». *J Virol*, vol. 84, no 17, p. 8650-8663. En ligne. <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20554775>>.
- Ao, Z., G. Huang, H. Yao, Z. Xu, M. Labine, A. W. Cochrane et X. Yao. 2007. «Interaction of human immunodeficiency virus type 1 integrase with cellular nuclear import receptor importin 7 and its impact on viral replication». *J Biol Chem*, vol. 282, no 18, p. 13456-13467. En ligne. <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17360709>>.
- Archin, N. M., A. Espeseth, D. Parker, M. Cheema, D. Hazuda et D. M. Margolis. 2009. «Expression of latent HIV induced by the potent HDAC inhibitor suberoylanilide hydroxamic acid». *AIDS Res Hum Retroviruses*, vol. 25, no 2, p. 207-212. En ligne. <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19239360>>.
- Arhel, N. 2010. «Revisiting HIV-1 uncoating». *Retrovirology*, vol. 7, p. 96. En ligne. <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21083892>>.
- Arhel, N., A. Genovesio, K. A. Kim, S. Miko, E. Perret, J. C. Olivo-Marin, S. Shorte et P. Charneau. 2006. «Quantitative four-dimensional tracking of cytoplasmic and nuclear HIV-1 complexes». *Nat Methods*, vol. 3, no 10, p. 817-824. En ligne. <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16990814>>.
- Arhel, N. J., S. Souquere-Besse, S. Munier, P. Souque, S. Guadagnini, S. Rutherford, M. C. Prevost, T. D. Allen et P. Charneau. 2007. «HIV-1 DNA Flap formation promotes uncoating of the pre-integration complex at the nuclear pore». *EMBO J*, vol. 26, no 12, p. 3025-3037. En ligne. <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17557080>>.
- Arhel, N., et F. Kirchhoff. 2010. «Host proteins involved in HIV infection: new therapeutic targets». *Biochim Biophys Acta*, vol. 1802, no 3, p. 313-321. En ligne. <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20018238>>.
- Arif, M., B. R. Selvi et T. K. Kundu. 2010. «Lysine acetylation: the tale of a modification from transcription regulation to metabolism». *Chembiochem*, vol. 11, no 11, p. 1501-1504. En ligne. <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20578118>>.



- Ariumi, Y., F. Serhan, P. Turelli, A. Telenti et D. Trono. 2006. «The integrase interactor 1 (INI1) proteins facilitate Tat-mediated human immunodeficiency virus type 1 transcription». *Retrovirology*, vol. 3, p. 47. En ligne. <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16889668>>.
- Arts, E. J., et D. J. Hazuda. 2012. «HIV-1 Antiretroviral Drug Therapy». *Cold Spring Harb Perspect Med*, vol. 2, no 4, p. a007161. En ligne. <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22474613>>.
- Balakrishnan, M., et C. B. Jonsson. 1997. «Functional identification of nucleotides conferring substrate specificity to retroviral integrase reactions». *J Virol*, vol. 71, no 2, p. 1025-1035. En ligne. <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8995622>>.
- Barber, S. A., L. Gama, J. M. Dudaronek, T. Voelker, P. M. Tarwater et J. E. Clements. 2006. «Mechanism for the establishment of transcriptional HIV latency in the brain in a simian immunodeficiency virus-macaque model». *J Infect Dis*, vol. 193, no 7, p. 963-970. En ligne. <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16518758>>.
- Barre-Sinoussi, F., J. C. Chermann, F. Rey, M. T. Nugeyre, S. Chamaret, J. Gruest, C. Dautet, C. Axler-Blin, F. Vezinet-Brun, C. Rouzioux, W. Rozenbaum et L. Montagnier. 1983. «Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS)». *Science*, vol. 220, no 4599, p. 868-871. En ligne. <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6189183>>.
- Batta, K., C. Das, S. Gadad, J. Shandilya et T. K. Kundu. 2007. «Reversible acetylation of non histone proteins: role in cellular function and disease». *Subcell Biochem*, vol. 41, p. 193-212. En ligne. <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17484129>>.
- Bauby, H., S. Lopez-Vergès, C. Berlioz-Torrent. 2008. TIP47, un cofacteur cellulaire essentiel à l'incorporation des glycoprotéines d'enveloppe du VIH-1 dans la particule virale. *Virologie*, 12: 201-19.
- Benyamini, H., A. Loyter et A. Friedler. 2011. «A structural model of the HIV-1 Rev-integrase complex: the molecular basis of integrase regulation by Rev». *Biochem Biophys Res Commun*, vol. 416, no 3-4, p. 252-257. En ligne. <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22093836>>.

- Bergamaschi, A., A. David, E. Le Rouzic, S. Nisole, F. Barre-Sinoussi et G. Pancino. 2009. «The CDK inhibitor p21Cip1/WAF1 is induced by FcγR activation and restricts the replication of human immunodeficiency virus type 1 and related primate lentiviruses in human macrophages». *J Virol*, vol. 83, no 23, p. 12253-12265. En ligne. <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19759136>>.
- Berkhout, B., et K. T. Jeang. 1989. «trans activation of human immunodeficiency virus type 1 is sequence specific for both the single-stranded bulge and loop of the trans-acting-responsive hairpin: a quantitative analysis». *J Virol*, vol. 63, no 12, p. 5501-5504. En ligne. <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2479775>>.
- Berkowitz, R., J. Fisher et S. P. Goff. 1996. «RNA packaging». *Curr Top Microbiol Immunol*, vol. 214, p. 177-218. En ligne. <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8791728>>.
- Berlioz-Torrent, C., B. L. Shacklett, L. Erdtmann, L. Delamarre, I. Bouchaert, P. Sonigo, M. C. Dokhelar et R. Benarous. 1999. «Interactions of the cytoplasmic domains of human and simian retroviral transmembrane proteins with components of the clathrin adaptor complexes modulate intracellular and cell surface expression of envelope glycoproteins». *J Virol*, vol. 73, no 2, p. 1350-1361. En ligne. <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9882340>>.
- Bishop, K. N., M. Verma, E. Y. Kim, S. M. Wolinsky et M. H. Malim. 2008. «APOBEC3G inhibits elongation of HIV-1 reverse transcripts». *PLoS Pathog*, vol. 4, no 12, p. e1000231. En ligne. <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19057663>>.
- Boese, A., P. Sommer, D. Holzer, R. Maier et U. Nehrbass. 2009. «Integrase interactor 1 (Ini1/hSNF5) is a repressor of basal human immunodeficiency virus type 1 promoter activity». *J Gen Virol*, vol. 90, no Pt 10, p. 2503-2512. En ligne. <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19515827>>.
- Boge, M., S. Wyss, J. S. Bonifacino et M. Thali. 1998. «A membrane-proximal tyrosine-based signal mediates internalization of the HIV-1 envelope glycoprotein via interaction with the AP-2 clathrin adaptor». *J Biol Chem*, vol. 273, no 25, p. 15773-15778. En ligne. <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9624176>>.
- Bolden, J. E., M. J. Peart et R. W. Johnstone. 2006. «Anticancer activities of histone deacetylase inhibitors». *Nat Rev Drug Discov*, vol. 5, no 9, p. 769-784. En ligne. <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16955068>>.

- Bouamr, F., J. A. Melillo, M. Q. Wang, K. Nagashima, M. de Los Santos, A. Rein et S. P. Goff. 2003. «PPPYVEPTAP motif is the late domain of human T-cell leukemia virus type 1 Gag and mediates its functional interaction with cellular proteins Nedd4 and Tsg101 [corrected]». *J Virol*, vol. 77, no 22, p. 11882-11895. En ligne. <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14581525>>.
- Bounou, S., J. E. Leclerc et M. J. Tremblay. 2002. «Presence of host ICAM-1 in laboratory and clinical strains of human immunodeficiency virus type 1 increases virus infectivity and CD4(+)-T-cell depletion in human lymphoid tissue, a major site of replication in vivo». *J Virol*, vol. 76, no 3, p. 1004-1014. En ligne. <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11773376>>.
- Brandt, S., M. Blissenbach, B. Grewe, R. Konietzny, T. Grunwald et K. Uberla. 2007. «Rev proteins of human and simian immunodeficiency virus enhance RNA encapsidation». *PLoS Pathog*, vol. 3, no 4, p. e54. En ligne. <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17432934>>.
- Brass, A. L., D. M. Dykxhoorn, Y. Benita, N. Yan, A. Engelman, R. J. Xavier, J. Lieberman et S. J. Elledge. 2008. «Identification of host proteins required for HIV infection through a functional genomic screen». *Science*, vol. 319, no 5865, p. 921-926. En ligne. <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18187620>>.
- Briones, M. S., C. W. Dobard et S. A. Chow. 2010. «Role of human immunodeficiency virus type 1 integrase in uncoating of the viral core». *J Virol*, vol. 84, no 10, p. 5181-5190. En ligne. <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20219923>>.
- Brown, P. O., B. Bowerman, H. E. Varmus et J. M. Bishop. 1987. «Correct integration of retroviral DNA in vitro». *Cell*, vol. 49, no 3, p. 347-356. En ligne. <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3032450>>.
- , 1989. «Retroviral integration: structure of the initial covalent product and its precursor, and a role for the viral IN protein». *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 86, no 8, p. 2525-2529. En ligne. <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2539592>>.
- Bukrinsky, M. 2006. «SNFing HIV transcription». *Retrovirology*, vol. 3, p. 49. En ligne. <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16899112>>.
- Burdick, R., J. L. Smith, C. Chaipan, Y. Friew, J. Chen, N. J. Venkatachari, K. A. Delviks-Frankenberry, W. S. Hu et V. K. Pathak. 2010. «P body-associated

- protein Mov10 inhibits HIV-1 replication at multiple stages». *J Virol*, vol. 84, no 19, p. 10241-10253. En ligne. <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20668078>>.
- Bushman, F. D., et R. Craigie. 1991. «Activities of human immunodeficiency virus (HIV) integration protein in vitro: specific cleavage and integration of HIV DNA». *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 88, no 4, p. 1339-1343. En ligne. <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1847518>>.
- Bushman, F. D., T. Fujiwara et R. Craigie. 1990. «Retroviral DNA integration directed by HIV integration protein in vitro». *Science*, vol. 249, no 4976, p. 1555-1558. En ligne. <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2171144>>.
- Bushman, F. D., N. Malani, J. Fernandes, I. D'Orso, G. Cagney, T. L. Diamond, H. Zhou, D. J. Hazuda, A. S. Espeseth, R. Konig, S. Bandyopadhyay, T. Ideker, S. P. Goff, N. J. Krogan, A. D. Frankel, J. A. Young et S. K. Chanda. 2009. «Host cell factors in HIV replication: meta-analysis of genome-wide studies». *PLoS Pathog*, vol. 5, no 5, p. e1000437. En ligne. <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19478882>>.
- Cai, M., R. Zheng, M. Caffrey, R. Craigie, G. M. Clore et A. M. Gronenborn. 1997. «Solution structure of the N-terminal zinc binding domain of HIV-1 integrase». *Nat Struct Biol*, vol. 4, no 7, p. 567-577. En ligne. <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9228950>>.
- Cantin, R., J. F. Fortin, G. Lamontagne et M. Tremblay. 1997. «The presence of host-derived HLA-DR1 on human immunodeficiency virus type 1 increases viral infectivity». *J Virol*, vol. 71, no 3, p. 1922-1930. En ligne. <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9032323>>.
- Carter, C. L., C. Lin, C. Y. Liu, L. Yang et Z. R. Liu. 2010. «Phosphorylated p68 RNA helicase activates Snail1 transcription by promoting HDAC1 dissociation from the Snail1 promoter». *Oncogene*, vol. 29, no 39, p. 5427-5436. En ligne. <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20676135>>.
- Cereseto, A., L. Manganaro, M. I. Gutierrez, M. Terreni, A. Fittipaldi, M. Lusic, A. Marcello et M. Giacca. 2005. «Acetylation of HIV-1 integrase by p300 regulates viral integration». *EMBO J*, vol. 24, no 17, p. 3070-3081. En ligne. <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16096645>>.
- Chen, B., E. M. Vogan, H. Gong, J. J. Skehel, D. C. Wiley et S. C. Harrison. 2005. «Structure of an unliganded simian immunodeficiency virus gp120 core».



- Nature*, vol. 433, no 7028, p. 834-841. En ligne. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15729334>.
- Chen, G., X. Guo, F. Lv, Y. Xu et G. Gao. 2008. «p72 DEAD box RNA helicase is required for optimal function of the zinc-finger antiviral protein». *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 105, no 11, p. 4352-4357. En ligne. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18334637>.
- Chen, H., et A. Engelman. 1998. «The barrier-to-autointegration protein is a host factor for HIV type 1 integration». *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 95, no 26, p. 15270-15274. En ligne. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9860958>.
- , 2001. «Asymmetric processing of human immunodeficiency virus type 1 cDNA in vivo: implications for functional end coupling during the chemical steps of DNA transposition». *Mol Cell Biol*, vol. 21, no 20, p. 6758-6767. En ligne. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11564861>.
- Cherepanov, P., E. Devroe, P. A. Silver et A. Engelman. 2004. «Identification of an evolutionarily conserved domain in human lens epithelium-derived growth factor/transcriptional co-activator p75 (LEDGF/p75) that binds HIV-1 integrase». *J Biol Chem*, vol. 279, no 47, p. 48883-48892. En ligne. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15371438>.
- Cherepanov, P., G. N. Maertens et S. Hare. 2011. «Structural insights into the retroviral DNA integration apparatus». *Curr Opin Struct Biol*, vol. 21, no 2, p. 249-256. En ligne. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21277766>.
- Cherepanov, P., G. Maertens, P. Proost, B. Devreese, J. Van Beeumen, Y. Engelborghs, E. De Clercq et Z. Debyser. 2003. «HIV-1 integrase forms stable tetramers and associates with LEDGF/p75 protein in human cells». *J Biol Chem*, vol. 278, no 1, p. 372-381. En ligne. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12407101>.
- Cherepanov, P., W. Pluymers, A. Claeys, P. Proost, E. De Clercq et Z. Debyser. 2000. «High-level expression of active HIV-1 integrase from a synthetic gene in human cells». *FASEB J*, vol. 14, no 10, p. 1389-1399. En ligne. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10877832>.
- Cherrier, T., V. Le Douce, L. Redel, C. Marban, D. Aunis, O. Rohr et C. Schwartz. 2010. «[Molecular basis of HIV-1 latency - Part II: HIV-1 reactivation and therapeutic implications]». *Med Sci (Paris)*, vol. 26, no 3, p. 291-295. En ligne. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20346279>.

- Chhatbar, C., R. Mishra, A. Kumar et S. K. Singh. 2011. «HIV vaccine: hopes and hurdles». *Drug Discov Today*, vol. 16, no 21-22, p. 948-956. En ligne. <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21889604>>.
- Chiu, T. K., et D. R. Davies. 2004. «Structure and function of HIV-1 integrase». *Curr Top Med Chem*, vol. 4, no 9, p. 965-977. En ligne. <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15134551>>.
- Choe, H., M. Farzan, M. Konkel, K. Martin, Y. Sun, L. Marcon, M. Cayabyab, M. Berman, M. E. Dorf, N. Gerard, C. Gerard et J. Sodroski. 1998. «The orphan seven-transmembrane receptor apj supports the entry of primary T-cell-line-tropic and dualtropic human immunodeficiency virus type 1». *J Virol*, vol. 72, no 7, p. 6113-6118. En ligne. <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9621075>>.
- Chow, S. A., K. A. Vincent, V. Ellison et P. O. Brown. 1992. «Reversal of integration and DNA splicing mediated by integrase of human immunodeficiency virus». *Science*, vol. 255, no 5045, p. 723-726. En ligne. <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1738845>>.
- Christ, F., S. Shaw, J. Demeulemeester, B. A. Desimmie, A. Marchand, S. Butler, W. Smets, P. Chaltin, M. Westby, Z. Debyser et C. Pickford. 2012. «Small-Molecule Inhibitors of the LEDGF/p75 Binding Site of Integrase Block HIV Replication and Modulate Integrase Multimerization». *Antimicrob Agents Chemother*, vol. 56, no 8, p. 4365-4374. En ligne. <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22664975>>.
- Christ, F., W. Thys, J. De Rijck, R. Gijsbers, A. Albanese, D. Arosio, S. Emiliani, J. C. Rain, R. Benarous, A. Cereseto et Z. Debyser. 2008. «Transportin-SR2 imports HIV into the nucleus». *Curr Biol*, vol. 18, no 16, p. 1192-1202. En ligne. <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18722123>>.
- Christ, F., A. Voet, A. Marchand, S. Nicolet, B. A. Desimmie, D. Marchand, D. Bardiot, N. J. Van der Veken, B. Van Remoortel, S. V. Strelkov, M. De Maeyer, P. Chaltin et Z. Debyser. 2010. «Rational design of small-molecule inhibitors of the LEDGF/p75-integrase interaction and HIV replication». *Nat Chem Biol*, vol. 6, no 6, p. 442-448. En ligne. <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20473303>>.
- Chun, T. W., L. Carruth, D. Finzi, X. Shen, J. A. DiGiuseppe, H. Taylor, M. Hermankova, K. Chadwick, J. Margolick, T. C. Quinn, Y. H. Kuo, R. Brookmeyer, M. A. Zeiger, P. Barditch-Crovo et R. F. Siliciano. 1997. «Quantification of latent tissue reservoirs and total body viral load in HIV-1



- infection». *Nature*, vol. 387, no 6629, p. 183-188. En ligne. <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9144289>>.
- Chun, T. W., D. Finzi, J. Margolick, K. Chadwick, D. Schwartz et R. F. Siliciano. 1995. «In vivo fate of HIV-1-infected T cells: quantitative analysis of the transition to stable latency». *Nat Med*, vol. 1, no 12, p. 1284-1290. En ligne. <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7489410>>.
- Cimarelli, A., S. Sandin, S. Hoglund et J. Luban. 2000. «Basic residues in human immunodeficiency virus type 1 nucleocapsid promote virion assembly via interaction with RNA». *J Virol*, vol. 74, no 7, p. 3046-3057. En ligne. <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10708419>>.
- Ciuffi, A., et F. D. Bushman. 2006. «Retroviral DNA integration: HIV and the role of LEDGF/p75». *Trends Genet*, vol. 22, no 7, p. 388-395. En ligne. <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16730094>>.
- Ciuffi, A., M. Llano, E. Poeschla, C. Hoffmann, J. Leipzig, P. Shinn, J. R. Ecker et F. Bushman. 2005. «A role for LEDGF/p75 in targeting HIV DNA integration». *Nat Med*, vol. 11, no 12, p. 1287-1289. En ligne. <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16311605>>.
- Clague, M. J., et S. Urbe. 2003. «Hrs function: viruses provide the clue». *Trends Cell Biol*, vol. 13, no 12, p. 603-606. En ligne. <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14624836>>.
- Clapham, P. R., et S. Lu. 2011. «Vaccinology: precisely tuned antibodies nab HIV». *Nature*, vol. 477, no 7365, p. 416-417. En ligne. <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21938063>>.
- Clotet-Codina, I., B. Bosch, J. Senserrich, M. T. Fernandez-Figueras, R. Pena, E. Ballana, M. Bofill, B. Clotet et J. A. Este. 2009. «HIV endocytosis after dendritic cell to T cell viral transfer leads to productive virus infection». *Antiviral Res*, vol. 83, no 1, p. 94-98. En ligne. <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19501262>>.
- Cocude, C., M. J. Truong, O. Billaut-Mulot, V. Delsart, E. Darcissac, A. Capron, Y. Mouton et G. M. Bahr. 2003. «A novel cellular RNA helicase, RH116, differentially regulates cell growth, programmed cell death and human immunodeficiency virus type 1 replication». *J Gen Virol*, vol. 84, no Pt 12, p. 3215-3225. En ligne. <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14645903>>.

- Colin, L., et C. Van Lint. 2009. «Molecular control of HIV-1 postintegration latency: implications for the development of new therapeutic strategies». *Retrovirology*, vol. 6, p. 111. En ligne. <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19961595>>.
- Collins, K. L., B. K. Chen, S. A. Kalams, B. D. Walker et D. Baltimore. 1998. «HIV-1 Nef protein protects infected primary cells against killing by cytotoxic T lymphocytes». *Nature*, vol. 391, no 6665, p. 397-401. En ligne. <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9450757>>.
- Colman, P. M., et M. C. Lawrence. 2003. «The structural biology of type I viral membrane fusion». *Nat Rev Mol Cell Biol*, vol. 4, no 4, p. 309-319. En ligne. <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12671653>>.
- Coull, J. J., F. Romerio, J. M. Sun, J. L. Volker, K. M. Galvin, J. R. Davie, Y. Shi, U. Hansen et D. M. Margolis. 2000. «The human factors YY1 and LSF repress the human immunodeficiency virus type 1 long terminal repeat via recruitment of histone deacetylase 1». *J Virol*, vol. 74, no 15, p. 6790-6799. En ligne. <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10888618>>.
- Craig, J. M. 2005. «Heterochromatin--many flavours, common themes». *Bioessays*, vol. 27, no 1, p. 17-28. En ligne. <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15612037>>.
- Craigie, R. 2010. «Targeting HIV-1 DNA integration by swapping tethers». *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 107, no 7, p. 2735-2736. En ligne. <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20145107>>.
- Craigie, R., T. Fujiwara et F. Bushman. 1990. «The IN protein of Moloney murine leukemia virus processes the viral DNA ends and accomplishes their integration in vitro». *Cell*, vol. 62, no 4, p. 829-837. En ligne. <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2167180>>.
- Cravchik, A., et A. Matus. 1993. «A novel strategy for the immunological tagging of cDNA constructs». *Gene*, vol. 137, no 1, p. 139-143. En ligne. <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7506688>>.
- Craven, R. C., R. N. Harty, J. Paragas, P. Palese et J. W. Wills. 1999. «Late domain function identified in the vesicular stomatitis virus M protein by use of rhabdovirus-retrovirus chimeras». *J Virol*, vol. 73, no 4, p. 3359-3365. En ligne. <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10074190>>.

- Curtis, B. M., S. Scharnowske et A. J. Watson. 1992. «Sequence and expression of a membrane-associated C-type lectin that exhibits CD4-independent binding of human immunodeficiency virus envelope glycoprotein gp120». *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 89, no 17, p. 8356-8360. En ligne. <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1518869>>.
- D'Agostino, D. M., B. K. Felber, J. E. Harrison et G. N. Pavlakis. 1992. «The Rev protein of human immunodeficiency virus type 1 promotes polysomal association and translation of gag/pol and vpu/env mRNAs». *Mol Cell Biol*, vol. 12, no 3, p. 1375-1386. En ligne. <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1545819>>.
- Daniel, R., G. Kao, K. Taganov, J. G. Greger, O. Favorova, G. Merkel, T. J. Yen, R. A. Katz et A. M. Skalka. 2003. «Evidence that the retroviral DNA integration process triggers an ATR-dependent DNA damage response». *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 100, no 8, p. 4778-4783. En ligne. <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12679521>>.
- Daniel, R., R. A. Katz, G. Merkel, J. C. Hittle, T. J. Yen et A. M. Skalka. 2001. «Wortmannin potentiates integrase-mediated killing of lymphocytes and reduces the efficiency of stable transduction by retroviruses». *Mol Cell Biol*, vol. 21, no 4, p. 1164-1172. En ligne. <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11158303>>.
- Daniel, R., R. A. Katz et A. M. Skalka. 1999. «A role for DNA-PK in retroviral DNA integration». *Science*, vol. 284, no 5414, p. 644-647. En ligne. <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10213687>>.
- Darlix, J. L., J. Godet, R. Ivanyi-Nagy, P. Fosse, O. Mauffret et Y. Mely. 2011. «Flexible nature and specific functions of the HIV-1 nucleocapsid protein». *J Mol Biol*, vol. 410, no 4, p. 565-581. En ligne. <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21762801>>.
- Davis, B. N., A. C. Hilyard, G. Lagna et A. Hata. 2008. «SMAD proteins control DROSHA-mediated microRNA maturation». *Nature*, vol. 454, no 7200, p. 56-61. En ligne. <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18548003>>.
- de Noronha, C. M., M. P. Sherman, H. W. Lin, M. V. Cavrois, R. D. Moir, R. D. Goldman et W. C. Greene. 2001. «Dynamic disruptions in nuclear envelope architecture and integrity induced by HIV-1 Vpr». *Science*, vol. 294, no 5544, p. 1105-1108. En ligne. <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11691994>>.



- De Rijck, J., L. Vandekerckhove, R. Gijsbers, A. Hombrouck, J. Hendrix, J. Vercammen, Y. Engelborghs, F. Christ et Z. Debyser. 2006. «Overexpression of the lens epithelium-derived growth factor/p75 integrase binding domain inhibits human immunodeficiency virus replication». *J Virol*, vol. 80, no 23, p. 11498-11509. En ligne. <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16987986>>.
- Delelis, O., K. Carayon, A. Saib, E. Deprez et J. F. Mouscadet. 2008. «Integrase and integration: biochemical activities of HIV-1 integrase». *Retrovirology*, vol. 5, p. 114. En ligne. <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19091057>>.
- Dell'Angelica, E. C., V. Shotelersuk, R. C. Aguilar, W. A. Gahl et J. S. Bonifacino. 1999. «Altered trafficking of lysosomal proteins in Hermansky-Pudlak syndrome due to mutations in the beta 3A subunit of the AP-3 adaptor». *Mol Cell*, vol. 3, no 1, p. 11-21. En ligne. <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10024875>>.
- Desfarges, S., J. San Filippo, M. Fournier, C. Calmels, A. Caumont-Sarcos, S. Litvak, P. Sung et V. Parissi. 2006. «Chromosomal integration of LTR-flanked DNA in yeast expressing HIV-1 integrase: down regulation by RAD51». *Nucleic Acids Res*, vol. 34, no 21, p. 6215-6224. En ligne. <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17090598>>.
- Dignam, J. D., R. M. Lebovitz et R. G. Roeder. 1983. «Accurate transcription initiation by RNA polymerase II in a soluble extract from isolated mammalian nuclei». *Nucleic Acids Res*, vol. 11, no 5, p. 1475-1489. En ligne. <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6828386>>.
- Ding, L., A. Derdowski, J. J. Wang et P. Spearman. 2003. «Independent segregation of human immunodeficiency virus type 1 Gag protein complexes and lipid rafts». *J Virol*, vol. 77, no 3, p. 1916-1926. En ligne. <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12525626>>.
- Dobard, C. W., M. S. Briones et S. A. Chow. 2007. «Molecular mechanisms by which human immunodeficiency virus type 1 integrase stimulates the early steps of reverse transcription». *J Virol*, vol. 81, no 18, p. 10037-10046. En ligne. <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17626089>>.
- Dorfman, T., F. Mammano, W. A. Haseltine et H. G. Gottlinger. 1994. «Role of the matrix protein in the virion association of the human immunodeficiency virus type 1 envelope glycoprotein». *J Virol*, vol. 68, no 3, p. 1689-1696. En ligne. <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8107229>>.

- Easley, R., L. Carpio, L. Dannenberg, S. Choi, D. Alani, R. Van Duyne, I. Guendel, Z. Klase, E. Agbottah, K. Kehn-Hall et F. Kashanchi. 2010a. «Transcription through the HIV-1 nucleosomes: effects of the PBAF complex in Tat activated transcription». *Virology*, vol. 405, no 2, p. 322-333. En ligne. <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20599239>>.
- Easley, R., R. Van Duyne, W. Coley, I. Guendel, S. Dadgar, K. Kehn-Hall et F. Kashanchi. 2010b. «Chromatin dynamics associated with HIV-1 Tat-activated transcription». *Biochim Biophys Acta*, vol. 1799, no 3-4, p. 275-285. En ligne. <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19716452>>.
- Ebina, H., J. Aoki, S. Hatta, T. Yoshida et Y. Koyanagi. 2004. «Role of Nup98 in nuclear entry of human immunodeficiency virus type 1 cDNA». *Microbes Infect*, vol. 6, no 8, p. 715-724. En ligne. <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15207818>>.
- Eckert, D. M., et P. S. Kim. 2001. «Mechanisms of viral membrane fusion and its inhibition». *Annu Rev Biochem*, vol. 70, p. 777-810. En ligne. <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11395423>>.
- Ellison, V., H. Abrams, T. Roe, J. Lifson et P. Brown. 1990. «Human immunodeficiency virus integration in a cell-free system». *J Virol*, vol. 64, no 6, p. 2711-2715. En ligne. <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2335814>>.
- Emiliani, S., A. Mousnier, K. Busschots, M. Maroun, B. Van Maele, D. Tempe, L. Vandekerckhove, F. Moisan, L. Ben-Slama, M. Witvrouw, F. Christ, J. C. Rain, C. Dargemont, Z. Debyser et R. Benarous. 2005. «Integrase mutants defective for interaction with LEDGF/p75 are impaired in chromosome tethering and HIV-1 replication». *J Biol Chem*, vol. 280, no 27, p. 25517-25523. En ligne. <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15855167>>.
- Engelman, A. 1999. «In vivo analysis of retroviral integrase structure and function». *Adv Virus Res*, vol. 52, p. 411-426. En ligne. <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10384245>>.
- , 2003. «The roles of cellular factors in retroviral integration». *Curr Top Microbiol Immunol*, vol. 281, p. 209-238. En ligne. <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12932079>>.
- Engelman, A., et P. Cherepanov. 2012. «The structural biology of HIV-1: mechanistic and therapeutic insights». *Nat Rev Microbiol*, vol. 10, no 4, p. 279-290. En ligne. <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22421880>>.

- Engelman, A., et R. Craigie. 1992. «Identification of conserved amino acid residues critical for human immunodeficiency virus type 1 integrase function in vitro». *J Virol*, vol. 66, no 11, p. 6361-6369. En ligne. <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1404595>>.
- Engelman, A., G. Englund, J. M. Orenstein, M. A. Martin et R. Craigie. 1995. «Multiple effects of mutations in human immunodeficiency virus type 1 integrase on viral replication». *J Virol*, vol. 69, no 5, p. 2729-2736. En ligne. <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7535863>>.
- Engelman, A., K. Mizuuchi et R. Craigie. 1991. «HIV-1 DNA integration: mechanism of viral DNA cleavage and DNA strand transfer». *Cell*, vol. 67, no 6, p. 1211-1221. En ligne. <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1760846>>.
- Fang, J., S. Kubota, B. Yang, N. Zhou, H. Zhang, R. Godbout et R. J. Pomerantz. 2004. «A DEAD box protein facilitates HIV-1 replication as a cellular co-factor of Rev». *Virology*, vol. 330, no 2, p. 471-480. En ligne. <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15567440>>.
- Farnet, C. M., et F. D. Bushman. 1997. «HIV-1 cDNA integration: requirement of HMG I(Y) protein for function of preintegration complexes in vitro». *Cell*, vol. 88, no 4, p. 483-492. En ligne. <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9038339>>.
- Farnet, C. M., et W. A. Haseltine. 1990. «Integration of human immunodeficiency virus type 1 DNA in vitro». *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 87, no 11, p. 4164-4168. En ligne. <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2349226>>.
- Fassati, A., D. Gorlich, I. Harrison, L. Zaytseva et J. M. Mingot. 2003. «Nuclear import of HIV-1 intracellular reverse transcription complexes is mediated by importin 7». *EMBO J*, vol. 22, no 14, p. 3675-3685. En ligne. <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12853482>>.
- Faure, A., C. Calmels, C. Desjobert, M. Castroviejo, A. Caumont-Sarcos, L. Tarrago-Litvak, S. Litvak et V. Parissi. 2005. «HIV-1 integrase crosslinked oligomers are active in vitro». *Nucleic Acids Res*, vol. 33, no 3, p. 977-986. En ligne. <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15718297>>.
- Faust, E. A., et H. Triller. 2002. «Stimulation of human flap endonuclease 1 by human immunodeficiency virus type 1 integrase: possible role for flap endonuclease 1 in 5'-end processing of human immunodeficiency virus type 1



- integration intermediates». *J Biomed Sci*, vol. 9, no 3, p. 273-287. En ligne. <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12065902>>.
- Finzi, A., A. Brunet, Y. Xiao, J. Thibodeau et E. A. Cohen. 2006. «Major histocompatibility complex class II molecules promote human immunodeficiency virus type 1 assembly and budding to late endosomal/multivesicular body compartments». *J Virol*, vol. 80, no 19, p. 9789-9797. En ligne. <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16973583>>.
- Finzi, D., M. Hermankova, T. Pierson, L. M. Carruth, C. Buck, R. E. Chaisson, T. C. Quinn, K. Chadwick, J. Margolick, R. Brookmeyer, J. Gallant, M. Markowitz, D. D. Ho, D. D. Richman et R. F. Siliciano. 1997. «Identification of a reservoir for HIV-1 in patients on highly active antiretroviral therapy». *Science*, vol. 278, no 5341, p. 1295-1300. En ligne. <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9360927>>.
- Fortin, J. F., R. Cantin, G. Lamontagne et M. Tremblay. 1997. «Host-derived ICAM-1 glycoproteins incorporated on human immunodeficiency virus type 1 are biologically active and enhance viral infectivity». *J Virol*, vol. 71, no 5, p. 3588-3596. En ligne. <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9094631>>.
- Freed, E. O. 1998. «HIV-1 gag proteins: diverse functions in the virus life cycle». *Virology*, vol. 251, no 1, p. 1-15. En ligne. <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9813197>>.
- , 2001. «HIV-1 replication». *Somat Cell Mol Genet*, vol. 26, no 1-6, p. 13-33. En ligne. <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12465460>>.
- , 2002. «Viral late domains». *J Virol*, vol. 76, no 10, p. 4679-4687. En ligne. <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11967285>>.
- Freed, E. O., et M. A. Martin. 1995. «Virion incorporation of envelope glycoproteins with long but not short cytoplasmic tails is blocked by specific, single amino acid substitutions in the human immunodeficiency virus type 1 matrix». *J Virol*, vol. 69, no 3, p. 1984-1989. En ligne. <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7853546>>.
- Friedrich, B. M., N. Dziuba, G. Li, M. A. Endsley, J. L. Murray et M. R. Ferguson. 2011. «Host factors mediating HIV-1 replication». *Virus Res*, vol. 161, no 2, p. 101-114. En ligne. <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21871504>>.

- Fu, W., et A. Rein. 1993. «Maturation of dimeric viral RNA of Moloney murine leukemia virus». *J Virol*, vol. 67, no 9, p. 5443-5449. En ligne. <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8350405>>.
- Fujiwara, T., et K. Mizuuchi. 1988. «Retroviral DNA integration: structure of an integration intermediate». *Cell*, vol. 54, no 4, p. 497-504. En ligne. <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3401925>>.
- Fukuda, T., K. Yamagata, S. Fujiyama, T. Matsumoto, I. Koshida, K. Yoshimura, M. Mihara, M. Naitou, H. Endoh, T. Nakamura, C. Akimoto, Y. Yamamoto, T. Katagiri, C. Foulds, S. Takezawa, H. Kitagawa, K. Takeyama, B. W. O'Malley et S. Kato. 2007. «DEAD-box RNA helicase subunits of the Drosha complex are required for processing of rRNA and a subset of microRNAs». *Nat Cell Biol*, vol. 9, no 5, p. 604-611. En ligne. <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17435748>>.
- Fuller-Pace, F. V., et H. C. Moore. 2011. «RNA helicases p68 and p72: multifunctional proteins with important implications for cancer development». *Future Oncol*, vol. 7, no 2, p. 239-251. En ligne. <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21345143>>.
- Gallay, P., T. Hope, D. Chin et D. Trono. 1997. «HIV-1 infection of nondividing cells through the recognition of integrase by the importin/karyopherin pathway». *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 94, no 18, p. 9825-9830. En ligne. <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9275210>>.
- Gallo, R. C., S. Z. Salahuddin, M. Popovic, G. M. Shearer, M. Kaplan, B. F. Haynes, T. J. Palker, R. Redfield, J. Oleske, B. Safai et al. 1984. «Frequent detection and isolation of cytopathic retroviruses (HTLV-III) from patients with AIDS and at risk for AIDS». *Science*, vol. 224, no 4648, p. 500-503. En ligne. <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6200936>>.
- Gallo, S. A., C. M. Finnegan, M. Viard, Y. Raviv, A. Dimitrov, S. S. Rawat, A. Puri, S. Durell et R. Blumenthal. 2003. «The HIV Env-mediated fusion reaction». *Biochim Biophys Acta*, vol. 1614, no 1, p. 36-50. En ligne. <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12873764>>.
- Gamble, T. R., F. F. Vajdos, S. Yoo, D. K. Worthylake, M. Houseweart, W. I. Sundquist et C. P. Hill. 1996. «Crystal structure of human cyclophilin A bound to the amino-terminal domain of HIV-1 capsid». *Cell*, vol. 87, no 7, p. 1285-1294. En ligne. <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8980234>>.

- Ganapathy, V., et C. A. Casiano. 2004. «Autoimmunity to the nuclear autoantigen DFS70 (LEDGF): what exactly are the autoantibodies trying to tell us?». *Arthritis Rheum*, vol. 50, no 3, p. 684-688. En ligne. <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15022305>>.
- Ganser-Pornillos, B. K., M. Yeager et W. I. Sundquist. 2008. «The structural biology of HIV assembly». *Curr Opin Struct Biol*, vol. 18, no 2, p. 203-217. En ligne. <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18406133>>.
- Gao, K., S. L. Butler et F. Bushman. 2001. «Human immunodeficiency virus type 1 integrase: arrangement of protein domains in active cDNA complexes». *EMBO J*, vol. 20, no 13, p. 3565-3576. En ligne. <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11432843>>.
- Garrus, J. E., U. K. von Schwedler, O. W. Pornillos, S. G. Morham, K. H. Zavitz, H. E. Wang, D. A. Wettstein, K. M. Stray, M. Cote, R. L. Rich, D. G. Myszka et W. I. Sundquist. 2001. «Tsg101 and the vacuolar protein sorting pathway are essential for HIV-1 budding». *Cell*, vol. 107, no 1, p. 55-65. En ligne. <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11595185>>.
- Ge, H., Y. Si et R. G. Roeder. 1998. «Isolation of cDNAs encoding novel transcription coactivators p52 and p75 reveals an alternate regulatory mechanism of transcriptional activation». *EMBO J*, vol. 17, no 22, p. 6723-6729. En ligne. <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9822615>>.
- Germann, S., L. Gratadou, E. Zonta, E. Dardenne, B. Gaudineau, M. Fougere, S. Samaan, M. Dutertre, S. Jauliac et D. Auboeuf. 2012. «Dual role of the ddx5/ddx17 RNA helicases in the control of the pro-migratory NFAT5 transcription factor». *Oncogene*. En ligne. <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22266867>>.
- Gifford, R. J. 2012. «Viral evolution in deep time: lentiviruses and mammals». *Trends Genet*, vol. 28, no 2, p. 89-100. En ligne. <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22197521>>.
- Gitti, R. K., B. M. Lee, J. Walker, M. F. Summers, S. Yoo et W. I. Sundquist. 1996. «Structure of the amino-terminal core domain of the HIV-1 capsid protein». *Science*, vol. 273, no 5272, p. 231-235. En ligne. <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8662505>>.
- Goh, P. Y., Y. J. Tan, S. P. Lim, Y. H. Tan, S. G. Lim, F. Fuller-Pace et W. Hong. 2004. «Cellular RNA helicase p68 relocalization and interaction with the hepatitis C virus (HCV) NS5B protein and the potential role of p68 in HCV



- RNA replication». *J Virol*, vol. 78, no 10, p. 5288-5298. En ligne. <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15113910>>.
- Goldgur, Y., F. Dyda, A. B. Hickman, T. M. Jenkins, R. Craigie et D. R. Davies. 1998. «Three new structures of the core domain of HIV-1 integrase: an active site that binds magnesium». *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 95, no 16, p. 9150-9154. En ligne. <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9689049>>.
- Goldschmidt, V. (2004) La rétrotranscription de VIH-1 : Etude du complexe d'initiation et des mécanismes de résistance aux inhibiteurs nucléosidiques. Ph D thesis, Louis Pasteur Strasbourg I University, pp : 241.
- Gottlinger, H. G., T. Dorfman, J. G. Sodroski et W. A. Haseltine. 1991. «Effect of mutations affecting the p6 gag protein on human immunodeficiency virus particle release». *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 88, no 8, p. 3195-3199. En ligne. <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2014240>>.
- Gottwein, E., J. Bodem, B. Muller, A. Schmechel, H. Zentgraf et H. G. Krausslich. 2003. «The Mason-Pfizer monkey virus PPPY and PSAP motifs both contribute to virus release». *J Virol*, vol. 77, no 17, p. 9474-9485. En ligne. <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12915562>>.
- Graci, J. D., J. M. Colacino, S. W. Peltz, J. P. Dougherty et Z. Gu. 2009. «HIV type-1 latency: targeted induction of proviral reservoirs». *Antivir Chem Chemother*, vol. 19, no 5, p. 177-187. En ligne. <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19483266>>.
- Grandgenett, D. P. 2005. «Symmetrical recognition of cellular DNA target sequences during retroviral integration». *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 102, no 17, p. 5903-5904. En ligne. <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15840713>>.
- Grandgenett, D. P., et G. Goodarzi. 1994. «Folding of the multidomain human immunodeficiency virus type-I integrase». *Protein Sci*, vol. 3, no 6, p. 888-897. En ligne. <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8069220>>.
- Greene, W. C., et B. M. Peterlin. 2002. «Charting HIV's remarkable voyage through the cell: Basic science as a passport to future therapy». *Nat Med*, vol. 8, no 7, p. 673-680. En ligne. <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12091904>>.
- Groom, H. C., E. C. Anderson, J. A. Dangerfield et A. M. Lever. 2009. «Rev regulates translation of human immunodeficiency virus type 1 RNAs». *J Gen*

- Viol*, vol. 90, no Pt 5, p. 1141-1147. En ligne. <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19264599>>.
- Grundstrom, T., W. M. Zenke, M. Wintzerith, H. W. Matthes, A. Staub et P. Chambon. 1985. «Oligonucleotide-directed mutagenesis by microscale 'shot-gun' gene synthesis». *Nucleic Acids Res*, vol. 13, no 9, p. 3305-3316. En ligne. <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3889852>>.
- Guo, F., S. Cen, M. Niu, J. Saadatmand et L. Kleiman. 2006. «Inhibition of formula-primed reverse transcription by human APOBEC3G during human immunodeficiency virus type 1 replication». *J Virol*, vol. 80, no 23, p. 11710-11722. En ligne. <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16971427>>.
- Ha, H. C., K. Juluri, Y. Zhou, S. Leung, M. Hermankova et S. H. Snyder. 2001. «Poly(ADP-ribose) polymerase-1 is required for efficient HIV-1 integration». *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 98, no 6, p. 3364-3368. En ligne. <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11248084>>.
- Hamamoto, S., H. Nishitsuji, T. Amagasa, M. Kannagi et T. Masuda. 2006. «Identification of a novel human immunodeficiency virus type 1 integrase interactor, Gemin2, that facilitates efficient viral cDNA synthesis in vivo». *J Virol*, vol. 80, no 12, p. 5670-5677. En ligne. <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16731905>>.
- Han, Y., K. Lassen, D. Monie, A. R. Sedaghat, S. Shimoji, X. Liu, T. C. Pierson, J. B. Margolick, R. F. Siliciano et J. D. Siliciano. 2004. «Resting CD4+ T cells from human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1)-infected individuals carry integrated HIV-1 genomes within actively transcribed host genes». *J Virol*, vol. 78, no 12, p. 6122-6133. En ligne. <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15163705>>.
- Hare, S., et P. Cherepanov. 2009. «The Interaction Between Lentiviral Integrase and LEDGF: Structural and Functional Insights». *Viruses*, vol. 1, no 3, p. 780-801. En ligne. <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21994569>>.
- Hare, S., S. S. Gupta, E. Valkov, A. Engelman et P. Cherepanov. 2010a. «Retroviral intasome assembly and inhibition of DNA strand transfer». *Nature*, vol. 464, no 7286, p. 232-236. En ligne. <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20118915>>.
- Hare, S., A. M. Vos, R. F. Clayton, J. W. Thuring, M. D. Cummings et P. Cherepanov. 2010b. «Molecular mechanisms of retroviral integrase inhibition and the evolution of viral resistance». *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 107, no

46, p. 20057-20062. En ligne.  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21030679>.

Harper, A. L., M. Sudol et M. Katzman. 2003. «An amino acid in the central catalytic domain of three retroviral integrases that affects target site selection in nonviral DNA». *J Virol*, vol. 77, no 6, p. 3838-3845. En ligne.  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12610159>.

Harris, R. S. 2008. «Enhancing immunity to HIV through APOBEC». *Nat Biotechnol*, vol. 26, no 10, p. 1089-1090. En ligne.  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18846074>.

Harris, R. S., K. N. Bishop, A. M. Sheehy, H. M. Craig, S. K. Petersen-Mahrt, I. N. Watt, M. S. Neuberger et M. H. Malim. 2003. «DNA deamination mediates innate immunity to retroviral infection». *Cell*, vol. 113, no 6, p. 803-809. En ligne.  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12809610>.

Hartley, O., H. Gaertner, J. Wilken, D. Thompson, R. Fish, A. Ramos, C. Pastore, B. Dufour, F. Cerini, A. Melotti, N. Heveker, L. Picard, M. Alizon, D. Mosier, S. Kent et R. Offord. 2004. «Medicinal chemistry applied to a synthetic protein: development of highly potent HIV entry inhibitors». *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 101, no 47, p. 16460-16465. En ligne.  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15545608>.

Hassig, C. A., J. K. Tong, T. C. Fleischer, T. Owa, P. G. Grable, D. E. Ayer et S. L. Schreiber. 1998. «A role for histone deacetylase activity in HDAC1-mediated transcriptional repression». *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 95, no 7, p. 3519-3524. En ligne.  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9520398>.

He, J., S. Choe, R. Walker, P. Di Marzio, D. O. Morgan et N. R. Landau. 1995. «Human immunodeficiency virus type 1 viral protein R (Vpr) arrests cells in the G2 phase of the cell cycle by inhibiting p34cdc2 activity». *J Virol*, vol. 69, no 11, p. 6705-6711. En ligne.  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7474080>.

Hehl, E. A., P. Joshi, G. V. Kalpana et V. R. Prasad. 2004. «Interaction between human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase and integrase proteins». *J Virol*, vol. 78, no 10, p. 5056-5067. En ligne.  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15113887>.

Hemelaar, J. 2012. «The origin and diversity of the HIV-1 pandemic». *Trends Mol Med*, vol. 18, no 3, p. 182-192. En ligne.  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22240486>.



- Henderson, A., A. Holloway, R. Reeves et D. J. Tremethick. 2004. «Recruitment of SWI/SNF to the human immunodeficiency virus type 1 promoter». *Mol Cell Biol*, vol. 24, no 1, p. 389-397. En ligne. <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14673171>>.
- Hermida-Matsumoto, L., et M. D. Resh. 1999. «Human immunodeficiency virus type 1 protease triggers a myristoyl switch that modulates membrane binding of Pr55(gag) and p17MA». *J Virol*, vol. 73, no 3, p. 1902-1908. En ligne. <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9971769>>.
- Heuer, T. S., et P. O. Brown. 1997. «Mapping features of HIV-1 integrase near selected sites on viral and target DNA molecules in an active enzyme-DNA complex by photo-cross-linking». *Biochemistry*, vol. 36, no 35, p. 10655-10665. En ligne. <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9271496>>.
- Hindmarsh, P., et J. Leis. 1999a. «Reconstitution of concerted DNA integration with purified components». *Adv Virus Res*, vol. 52, p. 397-410. En ligne. <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10384244>>.
- , 1999b. «Retroviral DNA integration». *Microbiol Mol Biol Rev*, vol. 63, no 4, p. 836-843, table of contents. En ligne. <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10585967>>.
- Hindmarsh, P., T. Ridky, R. Reeves, M. Andrade, A. M. Skalka et J. Leis. 1999. «HMG protein family members stimulate human immunodeficiency virus type 1 and avian sarcoma virus concerted DNA integration in vitro». *J Virol*, vol. 73, no 4, p. 2994-3003. En ligne. <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10074149>>.
- Ho, D. D., et P. D. Bieniasz. 2008. «HIV-1 at 25». *Cell*, vol. 133, no 4, p. 561-565. En ligne. <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18485860>>.
- Holman, A. G., et J. M. Coffin. 2005. «Symmetrical base preferences surrounding HIV-1, avian sarcoma/leukosis virus, and murine leukemia virus integration sites». *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 102, no 17, p. 6103-6107. En ligne. <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15802467>>.
- Huang, L., G. L. Xu, J. Q. Zhang, L. Tian, J. L. Xue, J. Z. Chen et W. Jia. 2008. «Daxx interacts with HIV-1 integrase and inhibits lentiviral gene expression». *Biochem Biophys Res Commun*, vol. 373, no 2, p. 241-245. En ligne. <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18558084>>.

- Huang, M., J. M. Orenstein, M. A. Martin et E. O. Freed. 1995. «p6Gag is required for particle production from full-length human immunodeficiency virus type 1 molecular clones expressing protease». *J Virol*, vol. 69, no 11, p. 6810-6818. En ligne. <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7474093>>.
- Hubner, W., G. P. McNerney, P. Chen, B. M. Dale, R. E. Gordon, F. Y. Chuang, X. D. Li, D. M. Asmuth, T. Huser et B. K. Chen. 2009. «Quantitative 3D video microscopy of HIV transfer across T cell virological synapses». *Science*, vol. 323, no 5922, p. 1743-1747. En ligne. <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19325119>>.
- Ikeda, T., H. Nishitsuji, X. Zhou, N. Nara, T. Ohashi, M. Kannagi et T. Masuda. 2004. «Evaluation of the functional involvement of human immunodeficiency virus type 1 integrase in nuclear import of viral cDNA during acute infection». *J Virol*, vol. 78, no 21, p. 11563-11573. En ligne. <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15479797>>.
- Imai, K., et T. Okamoto. 2006. «Transcriptional repression of human immunodeficiency virus type 1 by AP-4». *J Biol Chem*, vol. 281, no 18, p. 12495-12505. En ligne. <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16540471>>.
- Inayoshi, Y., Y. Okino, K. Miyake, A. Mizutani, J. Yamamoto-Kishikawa, Y. Kinoshita, Y. Morimoto, K. Imamura, M. Morshed, K. Kono, T. Itoh, K. Nishijima et S. Iijima. 2010. «Transcription factor YY1 interacts with retroviral integrases and facilitates integration of moloney murine leukemia virus cDNA into the host chromosomes». *J Virol*, vol. 84, no 16, p. 8250-8261. En ligne. <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20519390>>.
- Jacobs, A. M., S. M. Nicol, R. G. Hislop, E. G. Jaffray, R. T. Hay et F. V. Fuller-Pace. 2007. «SUMO modification of the DEAD box protein p68 modulates its transcriptional activity and promotes its interaction with HDAC1». *Oncogene*, vol. 26, no 40, p. 5866-5876. En ligne. <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17369852>>.
- Jacque, J. M., et M. Stevenson. 2006. «The inner-nuclear-envelope protein emerlin regulates HIV-1 infectivity». *Nature*, vol. 441, no 7093, p. 641-645. En ligne. <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16680152>>.
- Jacquot, G., S. Benichou. 2006. Import nucléaire du matériel génétique du virus de l'immunodéficience humaine de type 1. *Virologie*, 10 : 43-53.

- Janknecht, R. 2010. «Multi-talented DEAD-box proteins and potential tumor promoters: p68 RNA helicase (DDX5) and its paralog, p72 RNA helicase (DDX17)». *Am J Transl Res*, vol. 2, no 3, p. 223-234. En ligne. <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20589163>>.
- Jaskolski, M., J. N. Alexandratos, G. Bujacz et A. Wlodawer. 2009. «Piecing together the structure of retroviral integrase, an important target in AIDS therapy». *FEBS J*, vol. 276, no 11, p. 2926-2946. En ligne. <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19490099>>.
- Jayappa, K. D., Z. Ao, M. Yang, J. Wang et X. Yao. 2011. «Identification of critical motifs within HIV-1 integrase required for importin alpha3 interaction and viral cDNA nuclear import». *J Mol Biol*, vol. 410, no 5, p. 847-862. En ligne. <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21763491>>.
- Jeang, K-T. 2012. Multi-Faceted Post-Transcriptional Functions of HIV-1 Rev. *Biology*, 1:165-174.
- Jiang, G., A. Espeseth, D. J. Hazuda et D. M. Margolis. 2007. «c-Myc and Sp1 contribute to proviral latency by recruiting histone deacetylase 1 to the human immunodeficiency virus type 1 promoter». *J Virol*, vol. 81, no 20, p. 10914-10923. En ligne. <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17670825>>.
- Jouvenet, N., S. J. Neil, M. Zhadina, T. Zang, Z. Kratovac, Y. Lee, M. McNatt, T. Hatzioannou et P. D. Bieniasz. 2009. «Broad-spectrum inhibition of retroviral and filoviral particle release by tetherin». *J Virol*, vol. 83, no 4, p. 1837-1844. En ligne. <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19036818>>.
- Juan, L. J., W. J. Shia, M. H. Chen, W. M. Yang, E. Seto, Y. S. Lin et C. W. Wu. 2000. «Histone deacetylases specifically down-regulate p53-dependent gene activation». *J Biol Chem*, vol. 275, no 27, p. 20436-20443. En ligne. <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10777477>>.
- Kaehlcke, K., A. Dorr, C. Hetzer-Egger, V. Kiermer, P. Henklein, M. Schnoelzer, E. Loret, P. A. Cole, E. Verdin et M. Ott. 2003. «Acetylation of Tat defines a cyclinT1-independent step in HIV transactivation». *Mol Cell*, vol. 12, no 1, p. 167-176. En ligne. <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12887902>>.
- Kalpana, G. V., S. Marmon, W. Wang, G. R. Crabtree et S. P. Goff. 1994. «Binding and stimulation of HIV-1 integrase by a human homolog of yeast transcription factor SNF5». *Science*, vol. 266, no 5193, p. 2002-2006. En ligne. <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7801128>>.

- Katzman, M., et R. A. Katz. 1999. «Substrate recognition by retroviral integrases». *Adv Virus Res*, vol. 52, p. 371-395. En ligne. <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10384243>>.
- Katzmann, D. J., M. Babst et S. D. Emr. 2001. «Ubiquitin-dependent sorting into the multivesicular body pathway requires the function of a conserved endosomal protein sorting complex, ESCRT-I». *Cell*, vol. 106, no 2, p. 145-155. En ligne. <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11511343>>.
- Keedy, K. S., N. M. Archin, A. T. Gates, A. Espeseth, D. J. Hazuda et D. M. Margolis. 2009. «A limited group of class I histone deacetylases acts to repress human immunodeficiency virus type 1 expression». *J Virol*, vol. 83, no 10, p. 4749-4756. En ligne. <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19279091>>.
- Keele, B. F., L. Tazi, S. Gartner, Y. Liu, T. B. Burgon, J. D. Estes, T. C. Thacker, K. A. Crandall, J. C. McArthur et G. F. Burton. 2008. «Characterization of the follicular dendritic cell reservoir of human immunodeficiency virus type 1». *J Virol*, vol. 82, no 11, p. 5548-5561. En ligne. <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18385252>>.
- Kiernan, R. E., C. Vanhulle, L. Schiltz, E. Adam, H. Xiao, F. Maudoux, C. Calomme, A. Burny, Y. Nakatani, K. T. Jeang, M. Benkirane et C. Van Lint. 1999. «HIV-1 tat transcriptional activity is regulated by acetylation». *EMBO J*, vol. 18, no 21, p. 6106-6118. En ligne. <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10545121>>.
- Kilzer, J. M., T. Stracker, B. Beitzel, K. Meek, M. Weitzman et F. D. Bushman. 2003. «Roles of host cell factors in circularization of retroviral dna». *Virology*, vol. 314, no 1, p. 460-467. En ligne. <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14517098>>.
- Kimpton, J., et M. Emerman. 1992. «Detection of replication-competent and pseudotyped human immunodeficiency virus with a sensitive cell line on the basis of activation of an integrated beta-galactosidase gene». *J Virol*, vol. 66, no 4, p. 2232-2239. En ligne. <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1548759>>.
- Kirchhoff, F., T. C. Greenough, D. B. Brettler, J. L. Sullivan et R. C. Desrosiers. 1995. «Brief report: absence of intact nef sequences in a long-term survivor with nonprogressive HIV-1 infection». *N Engl J Med*, vol. 332, no 4, p. 228-232. En ligne. <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7808489>>.



- Klein, K. C., J. C. Reed et J. R. Lingappa. 2007. «Intracellular destinies: degradation, targeting, assembly, and endocytosis of HIV Gag». *AIDS Rev*, vol. 9, no 3, p. 150-161. En ligne. <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17982940>>.
- Kolb, S. J., D. J. Battle et G. Dreyfuss. 2007. «Molecular functions of the SMN complex». *J Child Neurol*, vol. 22, no 8, p. 990-994. En ligne. <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17761654>>.
- Konig, R., Y. Zhou, D. Elleder, T. L. Diamond, G. M. Bonamy, J. T. Irelan, C. Y. Chiang, B. P. Tu, P. D. De Jesus, C. E. Lilley, S. Seidel, A. M. Opaluch, J. S. Caldwell, M. D. Weitzman, K. L. Kuhen, S. Bandyopadhyay, T. Ideker, A. P. Orth, L. J. Miraglia, F. D. Bushman, J. A. Young et S. K. Chanda. 2008. «Global analysis of host-pathogen interactions that regulate early-stage HIV-1 replication». *Cell*, vol. 135, no 1, p. 49-60. En ligne. <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18854154>>.
- Kukolj, G., R. A. Katz et A. M. Skalka. 1998. «Characterization of the nuclear localization signal in the avian sarcoma virus integrase». *Gene*, vol. 223, no 1-2, p. 157-163. En ligne. <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9858717>>.
- Land, A., et I. Braakman. 2001. «Folding of the human immunodeficiency virus type 1 envelope glycoprotein in the endoplasmic reticulum». *Biochimie*, vol. 83, no 8, p. 783-790. En ligne. <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11530211>>.
- Lau, A., K. M. Swinbank, P. S. Ahmed, D. L. Taylor, S. P. Jackson, G. C. Smith et M. J. O'Connor. 2005. «Suppression of HIV-1 infection by a small molecule inhibitor of the ATM kinase». *Nat Cell Biol*, vol. 7, no 5, p. 493-500. En ligne. <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15834407>>.
- Le Borgne, R., A. Alconada, U. Bauer et B. Hoflack. 1998. «The mammalian AP-3 adaptor-like complex mediates the intracellular transport of lysosomal membrane glycoproteins». *J Biol Chem*, vol. 273, no 45, p. 29451-29461. En ligne. <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9792650>>.
- Lee, M. S., et R. Craigie. 1994. «Protection of retroviral DNA from autointegration: involvement of a cellular factor». *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 91, no 21, p. 9823-9827. En ligne. <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7937898>>.
- , 1998. «A previously unidentified host protein protects retroviral DNA from autointegration». *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 95, no 4, p. 1528-1533. En ligne. <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9465049>>.

- Lee, Y. M., et J. M. Coffin. 1991. «Relationship of avian retrovirus DNA synthesis to integration in vitro». *Mol Cell Biol*, vol. 11, no 3, p. 1419-1430. En ligne. <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1847499>>.
- Lever, A. M., et K. T. Jeang. 2011. «Insights into cellular factors that regulate HIV-1 replication in human cells». *Biochemistry*, vol. 50, no 6, p. 920-931. En ligne. <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21218853>>.
- Levin, A., Z. Hayouka, A. Friedler et A. Loyter. 2010a. «Nucleocytoplasmic shuttling of HIV-1 integrase is controlled by the viral Rev protein». *Nucleus*, vol. 1, no 2, p. 190-201. En ligne. <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21326951>>.
- , 2010b. «Transportin 3 and importin alpha are required for effective nuclear import of HIV-1 integrase in virus-infected cells». *Nucleus*, vol. 1, no 5, p. 422-431. En ligne. <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21326825>>.
- Levin, A., J. Rosenbluh, Z. Hayouka, A. Friedler et A. Loyter. 2010c. «Integration of HIV-1 DNA is regulated by interplay between viral rev and cellular LEDGF/p75 proteins». *Mol Med*, vol. 16, no 1-2, p. 34-44. En ligne. <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19855849>>.
- Levy, J. A., A. D. Hoffman, S. M. Kramer, J. A. Landis, J. M. Shimabukuro et L. S. Oshiro. 1984. «Isolation of lymphocytopathic retroviruses from San Francisco patients with AIDS». *Science*, vol. 225, no 4664, p. 840-842. En ligne. <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6206563>>.
- Lewinski, M. K., D. Bisgrove, P. Shinn, H. Chen, C. Hoffmann, S. Hannenhalli, E. Verdin, C. C. Berry, J. R. Ecker et F. D. Bushman. 2005. «Genome-wide analysis of chromosomal features repressing human immunodeficiency virus transcription». *J Virol*, vol. 79, no 11, p. 6610-6619. En ligne. <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15890899>>.
- Lewinski, M. K., et F. D. Bushman. 2005. «Retroviral DNA integration--mechanism and consequences». *Adv Genet*, vol. 55, p. 147-181. En ligne. <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16291214>>.
- Li, J., H. Tang, T. M. Mullen, C. Westberg, T. R. Reddy, D. W. Rose et F. Wong-Staal. 1999. «A role for RNA helicase A in post-transcriptional regulation of HIV type 1». *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 96, no 2, p. 709-714. En ligne. <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9892698>>.



- Li, L., E. A. Monckton et R. Godbout. 2008. «A role for DEAD box 1 at DNA double-strand breaks». *Mol Cell Biol*, vol. 28, no 20, p. 6413-6425. En ligne. <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18710941>>.
- Li, L., J. M. Olvera, K. E. Yoder, R. S. Mitchell, S. L. Butler, M. Lieber, S. L. Martin et F. D. Bushman. 2001. «Role of the non-homologous DNA end joining pathway in the early steps of retroviral infection». *EMBO J*, vol. 20, no 12, p. 3272-3281. En ligne. <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11406603>>.
- Li, M., et R. Craigie. 2005. «Processing of viral DNA ends channels the HIV-1 integration reaction to concerted integration». *J Biol Chem*, vol. 280, no 32, p. 29334-29339. En ligne. <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15958388>>.
- Li, M., M. Mizuuchi, T. R. Burke, Jr. et R. Craigie. 2006. «Retroviral DNA integration: reaction pathway and critical intermediates». *EMBO J*, vol. 25, no 6, p. 1295-1304. En ligne. <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16482214>>.
- Li, S., C. P. Hill, W. I. Sundquist et J. T. Finch. 2000. «Image reconstructions of helical assemblies of the HIV-1 CA protein». *Nature*, vol. 407, no 6802, p. 409-413. En ligne. <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11014200>>.
- Li, Z., Q. Zhang, J. H. Mao, A. Weise, K. Mrasek, X. Fan, X. Zhang, T. Liehr, K. H. Lu, A. Balmain et W. W. Cai. 2010. «An HDAC1-binding domain within FATS bridges p21 turnover to radiation-induced tumorigenesis». *Oncogene*, vol. 29, no 18, p. 2659-2671. En ligne. <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20154723>>.
- Lin, C. W., et A. Engelman. 2003. «The barrier-to-autointegration factor is a component of functional human immunodeficiency virus type 1 preintegration complexes». *J Virol*, vol. 77, no 8, p. 5030-5036. En ligne. <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12663813>>.
- Lingappa, J. R., R. L. Hill, M. L. Wong et R. S. Hegde. 1997. «A multistep, ATP-dependent pathway for assembly of human immunodeficiency virus capsids in a cell-free system». *J Cell Biol*, vol. 136, no 3, p. 567-581. En ligne. <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9024688>>.
- Llano, M., S. Delgado, M. Vanegas et E. M. Poeschla. 2004. «Lens epithelium-derived growth factor/p75 prevents proteasomal degradation of HIV-1 integrase». *J Biol Chem*, vol. 279, no 53, p. 55570-55577. En ligne. <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15475359>>.

- Llano, M., D. T. Saenz, A. Meehan, P. Wongthida, M. Peretz, W. H. Walker, W. Teo et E. M. Poeschla. 2006. «An essential role for LEDGF/p75 in HIV integration». *Science*, vol. 314, no 5798, p. 461-464. En ligne. <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16959972>>.
- Lloyd, A. G., S. Tateishi, P. D. Bieniasz, M. A. Muesing, M. Yamaizumi et L. C. Mulder. 2006. «Effect of DNA repair protein Rad18 on viral infection». *PLoS Pathog*, vol. 2, no 5, p. e40. En ligne. <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16710452>>.
- Lu, R., H. Z. Ghory et A. Engelman. 2005. «Genetic analyses of conserved residues in the carboxyl-terminal domain of human immunodeficiency virus type 1 integrase». *J Virol*, vol. 79, no 16, p. 10356-10368. En ligne. <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16051828>>.
- Luo, Y., W. Jian, D. Stavreva, X. Fu, G. Hager, J. Bungert, S. Huang et Y. Qiu. 2009. «Trans-regulation of histone deacetylase activities through acetylation». *J Biol Chem*, vol. 284, no 50, p. 34901-34910. En ligne. <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19822520>>.
- Ma, J., L. Rong, Y. Zhou, B. B. Roy, J. Lu, L. Abrahamyan, A. J. Mouland, Q. Pan et C. Liang. 2008. «The requirement of the DEAD-box protein DDX24 for the packaging of human immunodeficiency virus type 1 RNA». *Virology*, vol. 375, no 1, p. 253-264. En ligne. <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18289627>>.
- Ma, Y. M., et V. M. Vogt. 2002. «Rous sarcoma virus Gag protein-oligonucleotide interaction suggests a critical role for protein dimer formation in assembly». *J Virol*, vol. 76, no 11, p. 5452-5462. En ligne. <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11991973>>.
- Maertens, G., P. Cherepanov, W. Pluymers, K. Busschots, E. De Clercq, Z. Debyser et Y. Engelborghs. 2003. «LEDGF/p75 is essential for nuclear and chromosomal targeting of HIV-1 integrase in human cells». *J Biol Chem*, vol. 278, no 35, p. 33528-33539. En ligne. <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12796494>>.
- Maertens, G. N., S. Hare et P. Cherepanov. 2010. «The mechanism of retroviral integration from X-ray structures of its key intermediates». *Nature*, vol. 468, no 7321, p. 326-329. En ligne. <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21068843>>.

- Maga, G., F. Falchi, A. Garbelli, A. Belfiore, M. Witvrouw, F. Manetti et M. Botta. 2008. «Pharmacophore modeling and molecular docking led to the discovery of inhibitors of human immunodeficiency virus-1 replication targeting the human cellular aspartic acid-glutamic acid-alanine-aspartic acid box polypeptide 3». *J Med Chem*, vol. 51, no 21, p. 6635-6638. En ligne. <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18834110>>.
- Maga, G., F. Falchi, M. Radi, L. Botta, G. Casaluce, M. Bernardini, H. Irannejad, F. Manetti, A. Garbelli, A. Samuele, S. Zanolì, J. A. Este, E. Gonzalez, E. Zucca, S. Paolucci, F. Baldanti, J. De Rijck, Z. Debyser et M. Botta. 2011. «Toward the discovery of novel anti-HIV drugs. Second-generation inhibitors of the cellular ATPase DDX3 with improved anti-HIV activity: synthesis, structure-activity relationship analysis, cytotoxicity studies, and target validation». *ChemMedChem*, vol. 6, no 8, p. 1371-1389. En ligne. <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21698775>>.
- Mahmoudi, T., M. Parra, R. G. Vries, S. E. Kauder, C. P. Verrijzer, M. Ott et E. Verdin. 2006. «The SWI/SNF chromatin-remodeling complex is a cofactor for Tat transactivation of the HIV promoter». *J Biol Chem*, vol. 281, no 29, p. 19960-19968. En ligne. <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16687403>>.
- Maldarelli, F., M. A. Martin et K. Strebel. 1991. «Identification of posttranscriptionally active inhibitory sequences in human immunodeficiency virus type 1 RNA: novel level of gene regulation». *J Virol*, vol. 65, no 11, p. 5732-5743. En ligne. <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1656066>>.
- Mangeat, B., P. Turelli, G. Caron, M. Friedli, L. Perrin et D. Trono. 2003. «Broad antiretroviral defence by human APOBEC3G through lethal editing of nascent reverse transcripts». *Nature*, vol. 424, no 6944, p. 99-103. En ligne. <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12808466>>.
- Mansharamani, M., D. R. Graham, D. Monie, K. K. Lee, J. E. Hildreth, R. F. Siliciano et K. L. Wilson. 2003. «Barrier-to-autointegration factor BAF binds p55 Gag and matrix and is a host component of human immunodeficiency virus type 1 virions». *J Virol*, vol. 77, no 24, p. 13084-13092. En ligne. <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14645565>>.
- Mansky, L. M., et H. M. Temin. 1995. «Lower in vivo mutation rate of human immunodeficiency virus type 1 than that predicted from the fidelity of purified reverse transcriptase». *J Virol*, vol. 69, no 8, p. 5087-5094. En ligne. <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7541846>>.

- Marban, C., S. Suzanne, F. Dequiedt, S. de Walque, L. Redel, C. Van Lint, D. Aunis et O. Rohr. 2007. «Recruitment of chromatin-modifying enzymes by CTIP2 promotes HIV-1 transcriptional silencing». *EMBO J*, vol. 26, no 2, p. 412-423. En ligne. <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17245431>>.
- Margolis, D. M. 2010. «Mechanisms of HIV latency: an emerging picture of complexity». *Curr HIV/AIDS Rep*, vol. 7, no 1, p. 37-43. En ligne. <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20425056>>.
- Maroun, M., O. Delelis, G. Coadou, T. Bader, E. Segeral, G. Mbemba, C. Petit, P. Sonigo, J. C. Rain, J. F. Mouscadet, R. Benarous et S. Emiliani. 2006. «Inhibition of early steps of HIV-1 replication by SNF5/In1». *J Biol Chem*, vol. 281, no 32, p. 22736-22743. En ligne. <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16772295>>.
- Martin-Serrano, J., T. Zang et P. D. Bieniasz. 2001. «HIV-1 and Ebola virus encode small peptide motifs that recruit Tsg101 to sites of particle assembly to facilitate egress». *Nat Med*, vol. 7, no 12, p. 1313-1319. En ligne. <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11726971>>.
- Matsubara, M., T. Jing, K. Kawamura, N. Shimojo, K. Titani, K. Hashimoto et N. Hayashi. 2005. «Myristoyl moiety of HIV Nef is involved in regulation of the interaction with calmodulin in vivo». *Protein Sci*, vol. 14, no 2, p. 494-503. En ligne. <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15632291>>.
- Matsuoka, S., B. A. Ballif, A. Smogorzewska, E. R. McDonald, 3rd, K. E. Hurov, J. Luo, C. E. Bakalarski, Z. Zhao, N. Solimini, Y. Lerenthal, Y. Shiloh, S. P. Gygi et S. J. Elledge. 2007. «ATM and ATR substrate analysis reveals extensive protein networks responsive to DNA damage». *Science*, vol. 316, no 5828, p. 1160-1166. En ligne. <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17525332>>.
- Meadows, D. C., et J. Gervay-Hague. 2006. «Current developments in HIV chemotherapy». *ChemMedChem*, vol. 1, no 1, p. 16-29. En ligne. <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16892329>>.
- Melikyan, G. B., R. M. Markosyan, H. Hemmati, M. K. Delmedico, D. M. Lambert et F. S. Cohen. 2000. «Evidence that the transition of HIV-1 gp41 into a six-helix bundle, not the bundle configuration, induces membrane fusion». *J Cell Biol*, vol. 151, no 2, p. 413-423. En ligne. <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11038187>>.

- Miller, M. D., C. M. Farnet et F. D. Bushman. 1997. «Human immunodeficiency virus type 1 preintegration complexes: studies of organization and composition». *J Virol*, vol. 71, no 7, p. 5382-5390. En ligne. <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9188609>>.
- Miyauchi, K., Y. Kim, O. Latinovic, V. Morozov et G. B. Melikyan. 2009. «HIV enters cells via endocytosis and dynamin-dependent fusion with endosomes». *Cell*, vol. 137, no 3, p. 433-444. En ligne. <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19410541>>.
- Mohammed, K. D., M. B. Topper et M. A. Muesing. 2011. «Sequential deletion of the integrase (Gag-Pol) carboxyl terminus reveals distinct phenotypic classes of defective HIV-1». *J Virol*, vol. 85, no 10, p. 4654-4666. En ligne. <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21367893>>.
- Mooney, S. M., A. Goel, A. B. D'Assoro, J. L. Salisbury et R. Janknecht. 2010a. «Pleiotropic effects of p300-mediated acetylation on p68 and p72 RNA helicase». *J Biol Chem*, vol. 285, no 40, p. 30443-30452. En ligne. <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20663877>>.
- Mooney, S. M., J. P. Grande, J. L. Salisbury et R. Janknecht. 2010b. «Sumoylation of p68 and p72 RNA helicases affects protein stability and transactivation potential». *Biochemistry*, vol. 49, no 1, p. 1-10. En ligne. <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19995069>>.
- Morikawa, Y., D. J. Hockley, M. V. Nermut et I. M. Jones. 2000. «Roles of matrix, p2, and N-terminal myristoylation in human immunodeficiency virus type 1 Gag assembly». *J Virol*, vol. 74, no 1, p. 16-23. En ligne. <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10590086>>.
- Mousnier, A., N. Kubat, A. Massias-Simon, E. Segeral, J. C. Rain, R. Benarous, S. Emiliani et C. Dargemont. 2007. «von Hippel Lindau binding protein 1-mediated degradation of integrase affects HIV-1 gene expression at a postintegration step». *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 104, no 34, p. 13615-13620. En ligne. <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17698809>>.
- Muchardt, C., et M. Yaniv. 2001. «When the SWI/SNF complex remodels...the cell cycle». *Oncogene*, vol. 20, no 24, p. 3067-3075. En ligne. <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11420722>>.
- Mulder, L. C., L. A. Chakrabarti et M. A. Muesing. 2002. «Interaction of HIV-1 integrase with DNA repair protein hRad18». *J Biol Chem*, vol. 277, no 30, p. 27489-27493. En ligne. <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12016221>>.



- Mulder, L. C., et M. A. Muesing. 2000. «Degradation of HIV-1 integrase by the N-end rule pathway». *J Biol Chem*, vol. 275, no 38, p. 29749-29753. En ligne. <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10893419>>.
- Murakami, T. 2008. «Roles of the interactions between Env and Gag proteins in the HIV-1 replication cycle». *Microbiol Immunol*, vol. 52, no 5, p. 287-295. En ligne. <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18557900>>.
- Murakami, T., et E. O. Freed. 2000. «Genetic evidence for an interaction between human immunodeficiency virus type 1 matrix and alpha-helix 2 of the gp41 cytoplasmic tail». *J Virol*, vol. 74, no 8, p. 3548-3554. En ligne. <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10729129>>.
- Myers, E. L., et J. F. Allen. 2002. «Tsg101, an inactive homologue of ubiquitin ligase e2, interacts specifically with human immunodeficiency virus type 2 gag polyprotein and results in increased levels of ubiquitinated gag». *J Virol*, vol. 76, no 22, p. 11226-11235. En ligne. <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12388682>>.
- Myszka, D. G., R. W. Sweet, P. Hensley, M. Brigham-Burke, P. D. Kwong, W. A. Hendrickson, R. Wyatt, J. Sodroski et M. L. Doyle. 2000. «Energetics of the HIV gp120-CD4 binding reaction». *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 97, no 16, p. 9026-9031. En ligne. <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10922058>>.
- Naghavi, M. H., T. Hatzioannou, G. Gao et S. P. Goff. 2005. «Overexpression of fasciculation and elongation protein zeta-1 (FEZ1) induces a post-entry block to retroviruses in cultured cells». *Genes Dev*, vol. 19, no 9, p. 1105-1115. En ligne. <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15879557>>.
- Naji, S., G. Ambrus, P. Cimermancic, J. R. Reyes, J. R. Johnson, R. Filbrandt, M. D. Huber, P. Vesely, N. J. Krogan, J. R. Yates, 3rd, A. C. Saphire et L. Gerace. 2012. «Host cell interactome of HIV-1 Rev includes RNA helicases involved in multiple facets of virus production». *Mol Cell Proteomics*, vol. 11, no 4, p. M111 015313. En ligne. <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22174317>>.
- Nathans, R., H. Cao, N. Sharova, A. Ali, M. Sharkey, R. Stranska, M. Stevenson et T. M. Rana. 2008. «Small-molecule inhibition of HIV-1 Vif». *Nat Biotechnol*, vol. 26, no 10, p. 1187-1192. En ligne. <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18806783>>.



- Neil, S. J., T. Zang et P. D. Bieniasz. 2008. «Tetherin inhibits retrovirus release and is antagonized by HIV-1 Vpu». *Nature*, vol. 451, no 7177, p. 425-430. En ligne. <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18200009>>.
- Nilsen, B. M., I. R. Haugan, K. Berg, L. Olsen, P. O. Brown et D. E. Helland. 1996. «Monoclonal antibodies against human immunodeficiency virus type 1 integrase: epitope mapping and differential effects on integrase activities in vitro». *J Virol*, vol. 70, no 3, p. 1580-1587. En ligne. <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8627677>>.
- Nishitsuji, H., T. Hayashi, T. Takahashi, M. Miyano, M. Kannagi et T. Masuda. 2009. «Augmentation of reverse transcription by integrase through an interaction with host factor, SIP1/Gemin2 Is critical for HIV-1 infection». *PLoS One*, vol. 4, no 11, p. e7825. En ligne. <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19915660>>.
- Ohno, H., R. C. Aguilar, M. C. Fournier, S. Hennecke, P. Cosson et J. S. Bonifacino. 1997. «Interaction of endocytic signals from the HIV-1 envelope glycoprotein complex with members of the adaptor medium chain family». *Virology*, vol. 238, no 2, p. 305-315. En ligne. <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9400603>>.
- Ono, A., et E. O. Freed. 2001. «Plasma membrane rafts play a critical role in HIV-1 assembly and release». *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 98, no 24, p. 13925-13930. En ligne. <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11717449>>.
- Pancera, M. 2005. Structure, fonction et antigénicité des glycoprotéines d'enveloppe du virus de l'immunodéficience humaine de type 1 (VIH1). *Virologie*, 9 : 457-72.
- Parent, L. J., R. P. Bennett, R. C. Craven, T. D. Nelle, N. K. Krishna, J. B. Bowzard, C. B. Wilson, B. A. Puffer, R. C. Montelaro et J. W. Wills. 1995. «Positionally independent and exchangeable late budding functions of the Rous sarcoma virus and human immunodeficiency virus Gag proteins». *J Virol*, vol. 69, no 9, p. 5455-5460. En ligne. <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7636991>>.
- Parissi, V., C. Calmels, V. R. De Soultrait, A. Caumont, M. Fournier, S. Chaignepain et S. Litvak. 2001. «Functional interactions of human immunodeficiency virus type 1 integrase with human and yeast HSP60». *J Virol*, vol. 75, no 23, p. 11344-11353. En ligne. <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11689615>>.

- Perales, C., L. Carrasco et M. E. Gonzalez. 2005. «Regulation of HIV-1 env mRNA translation by Rev protein». *Biochim Biophys Acta*, vol. 1743, no 1-2, p. 169-175. En ligne. <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15777852>>.
- Perron, M. J., M. Stremlau, M. Lee, H. Javanbakht, B. Song et J. Sodroski. 2007. «The human TRIM5alpha restriction factor mediates accelerated uncoating of the N-tropic murine leukemia virus capsid». *J Virol*, vol. 81, no 5, p. 2138-2148. En ligne. <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17135314>>.
- Piatak, M., Jr., M. S. Saag, L. C. Yang, S. J. Clark, J. C. Kappes, K. C. Luk, B. H. Hahn, G. M. Shaw et J. D. Lifson. 1993. «High levels of HIV-1 in plasma during all stages of infection determined by competitive PCR». *Science*, vol. 259, no 5102, p. 1749-1754. En ligne. <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8096089>>.
- Pierson, T. C., et R. W. Doms. 2003. «HIV-1 entry and its inhibition». *Curr Top Microbiol Immunol*, vol. 281, p. 1-27. En ligne. <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12932074>>.
- Pierson, T., J. McArthur et R. F. Siliciano. 2000. «Reservoirs for HIV-1: mechanisms for viral persistence in the presence of antiviral immune responses and antiretroviral therapy». *Annu Rev Immunol*, vol. 18, p. 665-708. En ligne. <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10837072>>.
- Popov, S., E. Popova, M. Inoue et H. G. Gottlinger. 2008. «Human immunodeficiency virus type 1 Gag engages the Bro1 domain of ALIX/AIP1 through the nucleocapsid». *J Virol*, vol. 82, no 3, p. 1389-1398. En ligne. <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18032513>>.
- Radding, W., J. P. Williams, M. A. McKenna, R. Tummala, E. Hunter, E. M. Tytler et J. M. McDonald. 2000. «Calmodulin and HIV type 1: interactions with Gag and Gag products». *AIDS Res Hum Retroviruses*, vol. 16, no 15, p. 1519-1525. En ligne. <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11054265>>.
- Radi, M., F. Falchi, A. Garbelli, A. Samuele, V. Bernardo, S. Paolucci, F. Baldanti, S. Schenone, F. Manetti, G. Maga et M. Botta. 2012. «Discovery of the first small molecule inhibitor of human DDX3 specifically designed to target the RNA binding site: towards the next generation HIV-1 inhibitors». *Bioorg Med Chem Lett*, vol. 22, no 5, p. 2094-2098. En ligne. <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22300661>>.

- Ranji, A., et K. Boris-Lawrie. 2010. «RNA helicases: emerging roles in viral replication and the host innate response». *RNA Biol*, vol. 7, no 6, p. 775-787. En ligne. <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21173576>>.
- Reed, J. C., B. Molter, C. D. Geary, J. McNevin, J. McElrath, S. Giri, K. C. Klein et J. R. Lingappa. 2012. «HIV-1 Gag co-opts a cellular complex containing DDX6, a helicase that facilitates capsid assembly». *J Cell Biol*, vol. 198, no 3, p. 439-456. En ligne. <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22851315>>.
- Robertson-Anderson, R. M., J. Wang, S. P. Edgcomb, A. B. Carmel, J. R. Williamson et D. P. Millar. 2011. «Single-molecule studies reveal that DEAD box protein DDX1 promotes oligomerization of HIV-1 Rev on the Rev response element». *J Mol Biol*, vol. 410, no 5, p. 959-971. En ligne. <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21763499>>.
- Roos, J. W., M. F. Maughan, Z. Liao, J. E. Hildreth et J. E. Clements. 2000. «LuSIV cells: a reporter cell line for the detection and quantitation of a single cycle of HIV and SIV replication». *Virology*, vol. 273, no 2, p. 307-315. En ligne. <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10915601>>.
- Rosen, C. A., E. Terwilliger, A. Dayton, J. G. Sodroski et W. A. Haseltine. 1988. «Intragenic cis-acting art gene-responsive sequences of the human immunodeficiency virus». *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 85, no 7, p. 2071-2075. En ligne. <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2832844>>.
- Rosenbluh, J., Z. Hayouka, S. Loya, A. Levin, A. Armon-Omer, E. Britan, A. Hizi, M. Kotler, A. Friedler et A. Loyter. 2007. «Interaction between HIV-1 Rev and integrase proteins: a basis for the development of anti-HIV peptides». *J Biol Chem*, vol. 282, no 21, p. 15743-15753. En ligne. <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17403681>>.
- Rossow, K. L., et R. Janknecht. 2003. «Synergism between p68 RNA helicase and the transcriptional coactivators CBP and p300». *Oncogene*, vol. 22, no 1, p. 151-156. En ligne. <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12527917>>.
- Rous, B. A., B. J. Reaves, G. Ihrke, J. A. Briggs, S. R. Gray, D. J. Stephens, G. Banting et J. P. Luzio. 2002. «Role of adaptor complex AP-3 in targeting wild-type and mutated CD63 to lysosomes». *Mol Biol Cell*, vol. 13, no 3, p. 1071-1082. En ligne. <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11907283>>.
- Roy, B. B., J. Hu, X. Guo, R. S. Russell, F. Guo, L. Kleiman et C. Liang. 2006. «Association of RNA helicase a with human immunodeficiency virus type 1

- particles». *J Biol Chem*, vol. 281, no 18, p. 12625-12635. En ligne. <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16527808>>.
- Ryzhova, E. V., R. M. Vos, A. V. Albright, A. V. Harrist, T. Harvey et F. Gonzalez-Scarano. 2006. «Annexin 2: a novel human immunodeficiency virus type 1 Gag binding protein involved in replication in monocyte-derived macrophages». *J Virol*, vol. 80, no 6, p. 2694-2704. En ligne. <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16501079>>.
- Sakurai, Y., K. Komatsu, K. Agematsu et M. Matsuoka. 2009. «DNA double strand break repair enzymes function at multiple steps in retroviral infection». *Retrovirology*, vol. 6, p. 114. En ligne. <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20003485>>.
- Salvi, R., A. R. Garbuglia, A. Di Caro, S. Pulciani, F. Montella et A. Benedetto. 1998. «Grossly defective nef gene sequences in a human immunodeficiency virus type 1-seropositive long-term nonprogressor». *J Virol*, vol. 72, no 5, p. 3646-3657. En ligne. <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9557645>>.
- Sand-Dejmek, J., G. Adelmant, B. Sobhian, A. S. Calkins, J. Marto, D. J. Iglehart et J. B. Lazaro. 2011. «Concordant and opposite roles of DNA-PK and the "facilitator of chromatin transcription" (FACT) in DNA repair, apoptosis and necrosis after cisplatin». *Mol Cancer*, vol. 10, p. 74. En ligne. <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21679440>>.
- Sandefur, S., R. M. Smith, V. Varthakavi et P. Spearman. 2000. «Mapping and characterization of the N-terminal I domain of human immunodeficiency virus type 1 Pr55(Gag)». *J Virol*, vol. 74, no 16, p. 7238-7249. En ligne. <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10906178>>.
- Sarafianos, S. G., B. Marchand, K. Das, D. M. Himmel, M. A. Parniak, S. H. Hughes et E. Arnold. 2009. «Structure and function of HIV-1 reverse transcriptase: molecular mechanisms of polymerization and inhibition». *J Mol Biol*, vol. 385, no 3, p. 693-713. En ligne. <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19022262>>.
- Schroder, A. R., et D. Riesner. 2002. «Detection and analysis of hairpin II, an essential metastable structural element in viroid replication intermediates». *Nucleic Acids Res*, vol. 30, no 15, p. 3349-3359. En ligne. <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12140319>>.



- Schwartz, C., V. Le Douce, T. Cherrier, L. Redel, C. Marban, D. Aunis et O. Rohr. 2010. «[Molecular basis of HIV-1 latency - part I: physiology of HIV-1 latency]». *Med Sci (Paris)*, vol. 26, no 2, p. 159-163. En ligne. <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20188047>>.
- Seelamgari, A., A. Maddukuri, R. Berro, C. de la Fuente, K. Kehn, L. Deng, S. Dadgar, M. E. Bottazzi, E. Ghedin, A. Pumfery et F. Kashanchi. 2004. «Role of viral regulatory and accessory proteins in HIV-1 replication». *Front Biosci*, vol. 9, p. 2388-2413. En ligne. <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15353294>>.
- Sheehy, A. M., N. C. Gaddis et M. H. Malim. 2003. «The antiretroviral enzyme APOBEC3G is degraded by the proteasome in response to HIV-1 Vif». *Nat Med*, vol. 9, no 11, p. 1404-1407. En ligne. <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14528300>>.
- Shiloh, Y. 2003. «ATM and related protein kinases: safeguarding genome integrity». *Nat Rev Cancer*, vol. 3, no 3, p. 155-168. En ligne. <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12612651>>.
- Shin, S., et R. Janknecht. 2007. «Concerted activation of the Mdm2 promoter by p72 RNA helicase and the coactivators p300 and P/CAF». *J Cell Biochem*, vol. 101, no 5, p. 1252-1265. En ligne. <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17226766>>.
- Shoemaker, C., J. Hoffman, S. P. Goff et D. Baltimore. 1981. «Intramolecular integration within Moloney murine leukemia virus DNA». *J Virol*, vol. 40, no 1, p. 164-172. En ligne. <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6457158>>.
- Shun, M. C., N. K. Raghavendra, N. Vandegraaff, J. E. Daigle, S. Hughes, P. Kellam, P. Cherepanov et A. Engelman. 2007. «LEDGF/p75 functions downstream from preintegration complex formation to effect gene-specific HIV-1 integration». *Genes Dev*, vol. 21, no 14, p. 1767-1778. En ligne. <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17639082>>.
- Smith, J. A., F. X. Wang, H. Zhang, K. J. Wu, K. J. Williams et R. Daniel. 2008. «Evidence that the Nijmegen breakage syndrome protein, an early sensor of double-strand DNA breaks (DSB), is involved in HIV-1 post-integration repair by recruiting the ataxia telangiectasia-mutated kinase in a process similar to, but distinct from, cellular DSB repair». *Virol J*, vol. 5, p. 11. En ligne. <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18211700>>.

- Sorin, M., J. Cano, S. Das, S. Mathew, X. Wu, K. P. Davies, X. Shi, S. W. Cheng, D. Ott et G. V. Kalpana. 2009. «Recruitment of a SAP18-HDAC1 complex into HIV-1 virions and its requirement for viral replication». *PLoS Pathog*, vol. 5, no 6, p. e1000463. En ligne. <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19503603>>.
- Sorin, M., E. Yung, X. Wu et G. V. Kalpana. 2006. «HIV-1 replication in cell lines harboring INI1/hSNF5 mutations». *Retrovirology*, vol. 3, p. 56. En ligne. <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16945155>>.
- Starcich, B. R., B. H. Hahn, G. M. Shaw, P. D. McNeely, S. Modrow, H. Wolf, E. S. Parks, W. P. Parks, S. F. Josephs, R. C. Gallo et et al. 1986. «Identification and characterization of conserved and variable regions in the envelope gene of HTLV-III/LAV, the retrovirus of AIDS». *Cell*, vol. 45, no 5, p. 637-648. En ligne. <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2423250>>.
- Stopak, K., C. de Noronha, W. Yonemoto et W. C. Greene. 2003. «HIV-1 Vif blocks the antiviral activity of APOBEC3G by impairing both its translation and intracellular stability». *Mol Cell*, vol. 12, no 3, p. 591-601. En ligne. <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14527406>>.
- Stremlau, M., M. Perron, M. Lee, Y. Li, B. Song, H. Javanbakht, F. Diaz-Griffero, D. J. Anderson, W. I. Sundquist et J. Sodroski. 2006. «Specific recognition and accelerated uncoating of retroviral capsids by the TRIM5alpha restriction factor». *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 103, no 14, p. 5514-5519. En ligne. <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16540544>>.
- Strubin, M., J. W. Newell et P. Matthias. 1995. «OBF-1, a novel B cell-specific coactivator that stimulates immunoglobulin promoter activity through association with octamer-binding proteins». *Cell*, vol. 80, no 3, p. 497-506. En ligne. <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7859290>>.
- Studamire, B., et S. P. Goff. 2008. «Host proteins interacting with the Moloney murine leukemia virus integrase: multiple transcriptional regulators and chromatin binding factors». *Retrovirology*, vol. 5, p. 48. En ligne. <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18554410>>.
- Suzuki, H. I., K. Yamagata, K. Sugimoto, T. Iwamoto, S. Kato et K. Miyazono. 2009. «Modulation of microRNA processing by p53». *Nature*, vol. 460, no 7254, p. 529-533. En ligne. <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19626115>>.



- Suzuki, Y., et R. Craigie. 2007. «The road to chromatin - nuclear entry of retroviruses». *Nat Rev Microbiol*, vol. 5, no 3, p. 187-196. En ligne. <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17304248>>.
- Suzuki, Y., N. Misawa, C. Sato, H. Ebina, T. Masuda, N. Yamamoto et Y. Koyanagi. 2003. «Quantitative analysis of human immunodeficiency virus type 1 DNA dynamics by real-time PCR: integration efficiency in stimulated and unstimulated peripheral blood mononuclear cells». *Virus Genes*, vol. 27, no 2, p. 177-188. En ligne. <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14501196>>.
- Tastan, O., Y. Qi, J. G. Carbonell et J. Klein-Seetharaman. 2009. «Prediction of interactions between HIV-1 and human proteins by information integration». *Pac Symp Biocomput*, p. 516-527. En ligne. <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19209727>>.
- Terreni, M., P. Valentini, V. Liverani, M. I. Gutierrez, C. Di Primio, A. Di Fenza, V. Tozzini, A. Allouch, A. Albanese, M. Giacca et A. Cereseto. 2010. «GCN5-dependent acetylation of HIV-1 integrase enhances viral integration». *Retrovirology*, vol. 7, p. 18. En ligne. <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20226045>>.
- Tomita, M. 2010. «Involvement of DNA-PK and ATM in radiation- and heat-induced DNA damage recognition and apoptotic cell death». *J Radiat Res*, vol. 51, no 5, p. 493-501. En ligne. <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20814172>>.
- Topper, M., Y. Luo, M. Zhadina, K. Mohammed, L. Smith et M. A. Muesing. 2007. «Posttranslational acetylation of the human immunodeficiency virus type 1 integrase carboxyl-terminal domain is dispensable for viral replication». *J Virol*, vol. 81, no 6, p. 3012-3017. En ligne. <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17182677>>.
- Treand, C., I. du Chene, V. Bres, R. Kiernan, R. Benarous, M. Benkirane et S. Emiliani. 2006. «Requirement for SWI/SNF chromatin-remodeling complex in Tat-mediated activation of the HIV-1 promoter». *EMBO J*, vol. 25, no 8, p. 1690-1699. En ligne. <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16601680>>.
- Tritel, M., et M. D. Resh. 2000. «Kinetic analysis of human immunodeficiency virus type 1 assembly reveals the presence of sequential intermediates». *J Virol*, vol. 74, no 13, p. 5845-5855. En ligne. <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10846064>>.
- Trujillo, J. R., R. Rogers, R. M. Molina, F. Dangond, M. F. McLane, M. Essex et J. D. Brain. 2007. «Noninfectious entry of HIV-1 into peripheral and brain

- macrophages mediated by the mannose receptor». *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 104, no 12, p. 5097-5102. En ligne. <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17360361>>.
- Tsuchiya, H., T. Iseda et O. Hino. 1996. «Identification of a novel protein (VBP-1) binding to the von Hippel-Lindau (VHL) tumor suppressor gene product». *Cancer Res*, vol. 56, no 13, p. 2881-2885. En ligne. <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8674032>>.
- Turelli, P., V. Doucas, E. Craig, B. Mangeat, N. Klages, R. Evans, G. Kalpana et D. Trono. 2001. «Cytoplasmic recruitment of INI1 and PML on incoming HIV preintegration complexes: interference with early steps of viral replication». *Mol Cell*, vol. 7, no 6, p. 1245-1254. En ligne. <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11430827>>.
- Turlure, F., E. Devroe, P. A. Silver et A. Engelman. 2004. «Human cell proteins and human immunodeficiency virus DNA integration». *Front Biosci*, vol. 9, p. 3187-3208. En ligne. <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15353349>>.
- Tyagi, M., et J. Karn. 2007. «CBF-1 promotes transcriptional silencing during the establishment of HIV-1 latency». *EMBO J*, vol. 26, no 24, p. 4985-4995. En ligne. <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18007589>>.
- Uhlmann-Schiffler, H., O. G. Rossler et H. Stahl. 2002. «The mRNA of DEAD box protein p72 is alternatively translated into an 82-kDa RNA helicase». *J Biol Chem*, vol. 277, no 2, p. 1066-1075. En ligne. <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11675387>>.
- Vainberg, I. E., S. A. Lewis, H. Rommelaere, C. Ampe, J. Vandekerckhove, H. L. Klein et N. J. Cowan. 1998. «Prefoldin, a chaperone that delivers unfolded proteins to cytosolic chaperonin». *Cell*, vol. 93, no 5, p. 863-873. En ligne. <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9630229>>.
- Van Maele, B., K. Busschots, L. Vandekerckhove, F. Christ et Z. Debyser. 2006. «Cellular co-factors of HIV-1 integration». *Trends Biochem Sci*, vol. 31, no 2, p. 98-105. En ligne. <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16403635>>.
- Vandegraaff, N., E. Devroe, F. Turlure, P. A. Silver et A. Engelman. 2006. «Biochemical and genetic analyses of integrase-interacting proteins lens epithelium-derived growth factor (LEDGF)/p75 and hepatoma-derived growth factor related protein 2 (HRP2) in preintegration complex function and HIV-1 replication». *Virology*, vol. 346, no 2, p. 415-426. En ligne. <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16337983>>.

- Vandegraaff, N., et A. Engelman. 2007. «Molecular mechanisms of HIV integration and therapeutic intervention». *Expert Rev Mol Med*, vol. 9, no 6, p. 1-19. En ligne. <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17320002>>.
- Vanegas, M., M. Llano, S. Delgado, D. Thompson, M. Peretz et E. Poeschla. 2005. «Identification of the LEDGF/p75 HIV-1 integrase-interaction domain and NLS reveals NLS-independent chromatin tethering». *J Cell Sci*, vol. 118, no Pt 8, p. 1733-1743. En ligne. <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15797927>>.
- Vanitharani, R., S. Mahalingam, Y. Rafaeli, S. P. Singh, A. Srinivasan, D. B. Weiner et V. Ayyavoo. 2001. «HIV-1 Vpr transactivates LTR-directed expression through sequences present within -278 to -176 and increases virus replication in vitro». *Virology*, vol. 289, no 2, p. 334-342. En ligne. <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11689055>>.
- VerPlank, L., F. Bouamr, T. J. LaGrassa, B. Agresta, A. Kikonyogo, J. Leis et C. A. Carter. 2001. «Tsg101, a homologue of ubiquitin-conjugating (E2) enzymes, binds the L domain in HIV type 1 Pr55(Gag)». *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 98, no 14, p. 7724-7729. En ligne. <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11427703>>.
- Versteeg, I., N. Sevenet, J. Lange, M. F. Rousseau-Merck, P. Ambros, R. Handgretinger, A. Aurias et O. Delattre. 1998. «Truncating mutations of hSNF5/INI1 in aggressive paediatric cancer». *Nature*, vol. 394, no 6689, p. 203-206. En ligne. <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9671307>>.
- Vincent, K. A., D. York-Higgins, M. Quiroga et P. O. Brown. 1990. «Host sequences flanking the HIV provirus». *Nucleic Acids Res*, vol. 18, no 20, p. 6045-6047. En ligne. <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2235486>>.
- Vink, C., M. Groenink, Y. Elgersma, R. A. Fouchier, M. Tersmette et R. H. Plasterk. 1990. «Analysis of the junctions between human immunodeficiency virus type 1 proviral DNA and human DNA». *J Virol*, vol. 64, no 11, p. 5626-5627. En ligne. <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2214029>>.
- Vink, C., D. C. van Gent et R. H. Plasterk. 1990. «Integration of human immunodeficiency virus types 1 and 2 DNA in vitro by cytoplasmic extracts of Moloney murine leukemia virus-infected mouse NIH 3T3 cells». *J Virol*, vol. 64, no 10, p. 5219-5222. En ligne. <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2398544>>.



- Violot, S., S. S. Hong, D. Rakotobe, C. Petit, B. Gay, K. Moreau, G. Billaud, S. Priet, J. Sire, O. Schwartz, J. F. Mouscadet et P. Boulanger. 2003. «The human polycomb group EED protein interacts with the integrase of human immunodeficiency virus type 1». *J Virol*, vol. 77, no 23, p. 12507-12522. En ligne. <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14610174>>.
- Vodicka, M. A., D. M. Koepp, P. A. Silver et M. Emerman. 1998. «HIV-1 Vpr interacts with the nuclear transport pathway to promote macrophage infection». *Genes Dev*, vol. 12, no 2, p. 175-185. En ligne. <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9436978>>.
- Wang, H., X. Gao, Y. Huang, J. Yang et Z. R. Liu. 2009. «P68 RNA helicase is a nucleocytoplasmic shuttling protein». *Cell Res*, vol. 19, no 12, p. 1388-1400. En ligne. <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19786986>>.
- Wang, H., N. J. Machesky et L. M. Mansky. 2004. «Both the PPPY and PTAP motifs are involved in human T-cell leukemia virus type 1 particle release». *J Virol*, vol. 78, no 3, p. 1503-1512. En ligne. <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14722305>>.
- Warren, K., D. Warrilow, L. Meredith et D. Harrich. 2009. «Reverse Transcriptase and Cellular Factors: Regulators of HIV-1 Reverse Transcription». *Viruses*, vol. 1, no 3, p. 873-894. En ligne. <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21994574>>.
- Wei, P., M. E. Garber, S. M. Fang, W. H. Fischer et K. A. Jones. 1998. «A novel CDK9-associated C-type cyclin interacts directly with HIV-1 Tat and mediates its high-affinity, loop-specific binding to TAR RNA». *Cell*, vol. 92, no 4, p. 451-462. En ligne. <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9491887>>.
- Weissenhorn, W., A. Dessen, S. C. Harrison, J. J. Skehel et D. C. Wiley. 1997. «Atomic structure of the ectodomain from HIV-1 gp41». *Nature*, vol. 387, no 6631, p. 426-430. En ligne. <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9163431>>.
- Wieggers, K., G. Rutter, H. Kottler, U. Tessmer, H. Hohenberg et H. G. Krausslich. 1998. «Sequential steps in human immunodeficiency virus particle maturation revealed by alterations of individual Gag polyprotein cleavage sites». *J Virol*, vol. 72, no 4, p. 2846-2854. En ligne. <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9525604>>.
- Wightman, F., P. Ellenberg, M. Churchill et S. R. Lewin. 2012. «HDAC inhibitors in HIV». *Immunol Cell Biol*, vol. 90, no 1, p. 47-54. En ligne. <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22083528>>.

- Wilkinson, T. A., K. Januszyk, M. L. Phillips, S. S. Tekeste, M. Zhang, J. T. Miller, S. F. Le Grice, R. T. Clubb et S. A. Chow. 2009. «Identifying and characterizing a functional HIV-1 reverse transcriptase-binding site on integrase». *J Biol Chem*, vol. 284, no 12, p. 7931-7939. En ligne. <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19150986>>.
- Willetts, K. E., F. Rey, I. Agostini, J. M. Navarro, Y. Baudat, R. Vigne et J. Sire. 1999. «DNA repair enzyme uracil DNA glycosylase is specifically incorporated into human immunodeficiency virus type 1 viral particles through a Vpr-independent mechanism». *J Virol*, vol. 73, no 2, p. 1682-1688. En ligne. <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9882380>>.
- Williams, S. A., L. F. Chen, H. Kwon, C. M. Ruiz-Jarabo, E. Verdin et W. C. Greene. 2006. «NF-kappaB p50 promotes HIV latency through HDAC recruitment and repression of transcriptional initiation». *EMBO J*, vol. 25, no 1, p. 139-149. En ligne. <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16319923>>.
- Wilson, B. J., G. J. Bates, S. M. Nicol, D. J. Gregory, N. D. Perkins et F. V. Fuller-Pace. 2004. «The p68 and p72 DEAD box RNA helicases interact with HDAC1 and repress transcription in a promoter-specific manner». *BMC Mol Biol*, vol. 5, p. 11. En ligne. <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15298701>>.
- Wilson, B. J., et V. Giguere. 2007. «Identification of novel pathway partners of p68 and p72 RNA helicases through Oncomine meta-analysis». *BMC Genomics*, vol. 8, p. 419. En ligne. <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18005418>>.
- Witte, V., B. Laffert, O. Rosorius, P. Lischka, K. Blume, G. Galler, A. Stilper, D. Willbold, P. D'Aloja, M. Sixt, J. Kolanus, M. Ott, W. Kolanus, G. Schuler et A. S. Baur. 2004. «HIV-1 Nef mimics an integrin receptor signal that recruits the polycomb group protein Eed to the plasma membrane». *Mol Cell*, vol. 13, no 2, p. 179-190. En ligne. <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14759364>>.
- Wong, J. K., M. Hezareh, H. F. Gunthard, D. V. Havlir, C. C. Ignacio, C. A. Spina et D. D. Richman. 1997. «Recovery of replication-competent HIV despite prolonged suppression of plasma viremia». *Science*, vol. 278, no 5341, p. 1291-1295. En ligne. <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9360926>>.
- Worobey, M., M. Gemmel, D. E. Teuwen, T. Haselkorn, K. Kunstman, M. Bunce, J. J. Muyembe, J. M. Kabongo, R. M. Kalengayi, E. Van Marck, M. T. Gilbert et S. M. Wolinsky. 2008. «Direct evidence of extensive diversity of HIV-1 in

- Kinshasa by 1960». *Nature*, vol. 455, no 7213, p. 661-664. En ligne. <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18833279>>.
- Wu, X., Y. Li, B. Crise, S. M. Burgess et D. J. Munroe. 2005. «Weak palindromic consensus sequences are a common feature found at the integration target sites of many retroviruses». *J Virol*, vol. 79, no 8, p. 5211-5214. En ligne. <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15795304>>.
- Wu, X., H. Liu, H. Xiao, J. A. Conway, E. Hehl, G. V. Kalpana, V. Prasad et J. C. Kappes. 1999. «Human immunodeficiency virus type 1 integrase protein promotes reverse transcription through specific interactions with the nucleoprotein reverse transcription complex». *J Virol*, vol. 73, no 3, p. 2126-2135. En ligne. <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9971795>>.
- Wu, Y., et J. W. Marsh. 2001. «Selective transcription and modulation of resting T cell activity by preintegrated HIV DNA». *Science*, vol. 293, no 5534, p. 1503-1506. En ligne. <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11520990>>.
- Xing, L., C. Liang et L. Kleiman. 2011. «Coordinate roles of Gag and RNA helicase A in promoting the annealing of formula to HIV-1 RNA». *J Virol*, vol. 85, no 4, p. 1847-1860. En ligne. <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21106734>>.
- Yang, X. J., et E. Seto. 2007. «HATs and HDACs: from structure, function and regulation to novel strategies for therapy and prevention». *Oncogene*, vol. 26, no 37, p. 5310-5318. En ligne. <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17694074>>.
- Yedavalli, V. S., C. Neuveut, Y. H. Chi, L. Kleiman et K. T. Jeang. 2004. «Requirement of DDX3 DEAD box RNA helicase for HIV-1 Rev-RRE export function». *Cell*, vol. 119, no 3, p. 381-392. En ligne. <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15507209>>.
- Ylisastigui, L., N. M. Archin, G. Lehrman, R. J. Bosch et D. M. Margolis. 2004. «Coaxing HIV-1 from resting CD4 T cells: histone deacetylase inhibition allows latent viral expression». *AIDS*, vol. 18, no 8, p. 1101-1108. En ligne. <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15166525>>.
- Yoder, K. E., et F. D. Bushman. 2000. «Repair of gaps in retroviral DNA integration intermediates». *J Virol*, vol. 74, no 23, p. 11191-11200. En ligne. <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11070016>>.
- Yu, X., Y. Yu, B. Liu, K. Luo, W. Kong, P. Mao et X. F. Yu. 2003. «Induction of APOBEC3G ubiquitination and degradation by an HIV-1 Vif-Cul5-SCF



- complex». *Science*, vol. 302, no 5647, p. 1056-1060. En ligne. <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14564014>>.
- Yu, X., X. Yuan, Z. Matsuda, T. H. Lee et M. Essex. 1992. «The matrix protein of human immunodeficiency virus type 1 is required for incorporation of viral envelope protein into mature virions». *J Virol*, vol. 66, no 8, p. 4966-4971. En ligne. <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1629961>>.
- Yuan, B., S. Campbell, E. Bacharach, A. Rein et S. P. Goff. 2000. «Infectivity of Moloney murine leukemia virus defective in late assembly events is restored by late assembly domains of other retroviruses». *J Virol*, vol. 74, no 16, p. 7250-7260. En ligne. <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10906179>>.
- Yung, E., M. Sorin, A. Pal, E. Craig, A. Morozov, O. Delattre, J. Kappes, D. Ott et G. V. Kalpana. 2001. «Inhibition of HIV-1 virion production by a transdominant mutant of integrase interactor 1». *Nat Med*, vol. 7, no 8, p. 920-926. En ligne. <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11479624>>.
- Zaitseva, L., P. Cherepanov, L. Leyens, S. J. Wilson, J. Rasaiyaah et A. Fassati. 2009. «HIV-1 exploits importin 7 to maximize nuclear import of its DNA genome». *Retrovirology*, vol. 6, p. 11. En ligne. <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19193229>>.
- Zhang, J. Q., J. J. Wang, W. J. Li, L. Huang, L. Tian, J. L. Xue, J. Z. Chen et W. Jia. 2009. «Cellular protein TTRAP interacts with HIV-1 integrase to facilitate viral integration». *Biochem Biophys Res Commun*, vol. 387, no 2, p. 256-260. En ligne. <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19580783>>.
- Zheng, R., R. Ghirlando, M. S. Lee, K. Mizuuchi, M. Krause et R. Craigie. 2000. «Barrier-to-autointegration factor (BAF) bridges DNA in a discrete, higher-order nucleoprotein complex». *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 97, no 16, p. 8997-9002. En ligne. <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10908652>>.
- Zhou, H., M. Xu, Q. Huang, A. T. Gates, X. D. Zhang, J. C. Castle, E. Stec, M. Ferrer, B. Strulovici, D. J. Hazuda et A. S. Espeseth. 2008a. «Genome-scale RNAi screen for host factors required for HIV replication». *Cell Host Microbe*, vol. 4, no 5, p. 495-504. En ligne. <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18976975>>.
- Zhou, W., et M. D. Resh. 1996. «Differential membrane binding of the human immunodeficiency virus type 1 matrix protein». *J Virol*, vol. 70, no 12, p. 8540-8548. En ligne. <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8970978>>.

- Zhou, Y., J. Ma, B. Bushan Roy, J. Y. Wu, Q. Pan, L. Rong et C. Liang. 2008b. «The packaging of human immunodeficiency virus type 1 RNA is restricted by overexpression of an RNA helicase DHX30». *Virology*, vol. 372, no 1, p. 97-106. En ligne. <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18022663>>.
- Zhu, K., C. Dobard et S. A. Chow. 2004. «Requirement for integrase during reverse transcription of human immunodeficiency virus type 1 and the effect of cysteine mutations of integrase on its interactions with reverse transcriptase». *J Virol*, vol. 78, no 10, p. 5045-5055. En ligne. <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15113886>>.
- Zhu, T., B. T. Korber, A. J. Nahmias, E. Hooper, P. M. Sharp et D. D. Ho. 1998. «An African HIV-1 sequence from 1959 and implications for the origin of the epidemic». *Nature*, vol. 391, no 6667, p. 594-597. En ligne. <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9468138>>.
- Zhu, Y., G. Chen, F. Lv, X. Wang, X. Ji, Y. Xu, J. Sun, L. Wu, Y. T. Zheng et G. Gao. 2011. «Zinc-finger antiviral protein inhibits HIV-1 infection by selectively targeting multiply spliced viral mRNAs for degradation». *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 108, no 38, p. 15834-15839. En ligne. <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21876179>>.